







**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE VETERINARIE  
XXIX CICLO**

**CONTAMINANTI ORGANOCLORURATI IN  
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE QUALI  
INDICATORI DI CONTAMINAZIONE  
AMBIENTALE E DEL RISCHIO  
TOSSICOLOGICO PER IL CONSUMATORE**

**Candidato**

Dott.ssa Francesca  
Saggiomo

**Docente guida**

Ch.ma Prof.ssa Maria  
Carmela Ferrante

DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE - Segreteria *Dott.ssa Maria Teresa Cagiano*

Coordinamento - *Prof. Giuseppe Cringoli*



*Alla Prof.ssa Ferrante, che con pazienza e dedizione mi ha guidata in  
questo percorso.*

*Ai miei figli, la gioia della mia vita.*



|  |    |
|--|----|
| Abstract   | 15 |
| Introduzione   | 21 |
| Parte prima  | 27 |
| 1.1    Proprietà chimico-fisiche e impiego   | 29 |
| 1.1.1    Policlorobifenili   | 29 |
| 1.1.2    Pesticidi Organoclorurati   | 31 |
| 1.2    Destino dei contaminanti clorurati nei comparti ambientali  | 37 |
| 1.3    Cinetica  | 43 |
| 1.3.1    Policlorobifenili   | 43 |
| 1.3.2    Pesticidi Organoclorurati   | 45 |
| 1.4    Meccanismo d'azione ed effetti tossici  | 50 |
| 1.4.1    Policlorobifenili   | 50 |
| 1.4.2    Pesticidi Organoclorurati   | 55 |
| 1.4.3    Tossicità nelle specie ittiche  | 61 |
| 1.5    Monitoraggio ambientale   | 66 |
| Parte seconda - Sperimentale   | 81 |
| 2.1    Piano di lavoro   | 83 |
| 2.1.1    Analisi dei livelli di OC nel latte di capra  | 83 |
| 2.1.2    Analisi dei livelli di OC nel muscolo di trota Mediterranea<br>(Salmo trutta) del parco della Sila (Calabria) | 87 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 2.2   | Descrizione dei materiali e delle metodologie applicate   | 91  |
| 2.2.1 | Campionamento del latte di capra  | 91  |
| 2.2.2 | Campionamento del muscolo di trota Mediterranea   | 93  |
| 2.2.3 | Reagenti  | 94  |
| 2.2.4 | Metodica analitica per l'analisi degli OC nel latte di capra  | 94  |
| 2.2.5 | Metodica analitica per l'analisi degli OC nel muscolo di trota Mediterranea   | 100 |
| 2.2.6 | Analisi statistica  | 101 |
| 2.3   | Risultati e discussione   | 102 |
| 2.3.1 | Analisi dei livelli di PCB e POC nel latte di capra   | 102 |
| 2.3.2 | Analisi dei livelli di PCB e POC nel muscolo di trota Mediterranea, correlazione con il grado di infestazione da parassiti intestinali. | 110 |
| 2.3.3 | Valutazione del Rischio Tossicologico   | 123 |
| 2.4   | Conclusioni   | 128 |



## Lista delle abbreviazioni

|         |                                       |
|---------|---------------------------------------|
| PCB     | Policlorobifenile                     |
| PCB-DL  | Policlorobifenile diossina simile     |
| PCB-NDL | Policlorobifenile non diossina simile |
| OC      | Composti organoclorurati              |
| POC     | Pesticidi organoclorurati             |
| POP     | Inquinante organico persistente       |



Fig. 1-1 Struttura chimica generale dei bifenilipoliclorurati

Fig. 1-2. Strutture chimiche dei principali pesticidi organoclorurati

Fig. 1-3. Schema dei principali meccanismi di trasporto e destino globale dei contaminanti organici persistenti.

Fig. 2-1. Esemplare di trota Mediterranea (*Salmo trutta*)

Fig. 2-2. La figura mostra le aree della regione Campania dove è stato eseguito il campionamento.

Fig. 2-3. La figura evidenzia l'area di campionamento

Fig. 2-4. Livelli dei singoli congeneri di PCB espressi su base lipidica (LW).

Fig. 2-5. Retta di regressione del contenuto lipidico (espresso in percentuale) sulla  $\Sigma 20\text{PCB}$  relativa al latte di Caserta.

Fig. 2-5. Livelli di PCB per gruppi di composti espressi su base lipidica (LW).

Fig. 2-6. Livelli di PCB per gruppi di composti espressi su base fresca (WW).

Fig. 2-7. Livelli di singoli congeneri di PCB-NDL espressi su base lipidica (LW).

Fig. 2-8. Livelli di singoli congeneri di PCB-DL espressi su base lipidica (LW).

Fig. 2-9. Livelli di singoli POC espressi su base lipidica (LW)

Fig. 2-10. Livelli di singoli POC espressi su base fresca (WW)



Tab. 1–1. Utilizzo dei PCB nei sistemi aperti e chiusi

Tab. 1–2. Emivita di alcuni pesticidi organoclorurati nel tessuto adiposo e nel latte

Tab. 2–3. Composizione media del latte di varie specie e valore energetico (Polidori - 1994)

Tab. 2–4. Statistiche descrittive sulle concentrazioni di OC espresso su peso lipidico (LW) e peso fresco (WW) e contenuto lipidico (%).

Tab.2–5. Test della differenza tra medie relativo alle concentrazioni di OC espresse sul peso lipidico (LW) e sul peso fresco (WW) tra Caserta e l'area di controllo.

Tab. 2–6. Statistiche descrittive, Bifenilipoliclorurati NDL e DL (ng/g WW)

Tab. 2–7. Statistiche descrittive, Bifenilipoliclorurati NDL e DL (ng/g LW)

Tab. 2–8. Statistiche descrittive, Pesticidi Organoclorurati (ng/g WW)

Tab. 2–9. Statistiche descrittive, Pesticidi Organoclorurati (ng/g LW)

Tab. 2–10. Correlazione tra presenza di parassiti e organoclorurati.



## **Abstract**

I composti organoclorurati (OC) sono dei regolatori endocrini, cioè composti che compromettono il normale funzionamento del sistema endocrino. Nell'ambito degli OC, i bifenilipoliclorurati e i pesticidi organoclorurati sono considerati responsabili di diversi effetti tossici evidenziati sia negli esseri umani che nelle specie animali domestiche e selvatiche, come teratogenicità, cancro, disturbi riproduttivi e immunotossicità. Diversi autori hanno riportato che più del 90% dell'esposizione umana agli OC avviene principalmente attraverso il consumo di alimenti di origine animale, in particolare, il latte (e prodotti lattiero-caseari) e i prodotti della pesca. Questi alimenti possono essere considerati indicatori di inquinamento ambientale da OC e devono essere monitorati per una attenta valutazione del rischio tossicologico per il consumatore.

In una prima parte, il presente studio ha avuto l'obiettivo di valutare se l'abbandono incontrollato di rifiuti di origine urbana e industriale potesse essere responsabile della contaminazione degli alimenti da PCB. A tal fine, sono state confrontate le concentrazioni di PCB nel latte di capra raccolto in tre diverse aree della regione Campania. Una delle tre, Caserta, con il suo territorio circostante posto nel centro-nord della regione, da tempo subisce gli effetti negativi correlati alle attività illecite della cosiddetta "Ecomafia". Le altre due aree considerate, che fanno parte di due province diverse nel sud-est della Campania, dove le suddette attività sono praticamente assenti, hanno costituito il gruppo di controllo. Sono state rilevate concentrazioni molto elevate di PCB nel latte di Caserta (la somma dei sei PCB indicatori insieme al PCB 118 era pari a 209,10 ng/g su peso



lipidico) in contrasto con la quasi totale assenza di tali inquinanti nelle unità campionarie del gruppo di controllo. Dallo studio emerge la relazione tra siti contaminati per smaltimento illegale di rifiuti e contaminazione da PCB. Il problema che ne scaturisce deve essere considerato prioritario sia per l'ambiente che per la salute.

Allo stesso tempo, sono stati anche evidenziati valori più elevati di contenuto lipidico nel latte del gruppo di controllo e quindi una correlazione negativa tra le concentrazioni di PCB e il contenuto lipidico nel campione di Caserta.

Nella seconda parte di questa tesi di dottorato, è stato analizzato un campione di trote Mediterranee (*Salmo trutta*) raccolto nel Parco Nazionale della Sila (Calabria). Il contenuto di PCB e pesticidi organoclorurati nel muscolo di trota e nel latte di capra sono stati determinati avvalendosi di un gas-cromatografo munito di rivelatore a cattura di elettroni ( $\text{Ni}^{63}$ ).

La presenza di livelli residuali di PCB (la somma dei sei congeneri indicatori), è stata evidenziata in tutte le unità campionarie (in media 201.9 ng/g sul peso lipidico) e la presenza di p'p, DDE, il principale metabolita del DDT, è stata osservata nel 100% del campione (con una concentrazione media di 97.57 ng/g sul peso lipidico).

L'analisi di correlazione tra i livelli di concentrazione degli OC e la presenza di parassiti intestinali non ha evidenziato alcuna associazione tra le due variabili.

Circa la valutazione del rischio tossicologico, le concentrazioni di PCB rilevate nel latte di capra raccolto a Caserta erano al di sopra del limite

massimo fissato dalla UE, lasciando intravedere un rischio non trascurabile per la salute dei consumatori. Al contrario, i livelli di OC misurati nelle trote dalla Calabria, erano sempre al di sotto dei limiti stabiliti.

In conclusione, lo studio conferma l'utilità di impiegare il latte di capra e il muscolo di trota per valutare lo stato di inquinamento ambientale da contaminanti organici persistenti, e il derivante rischio per il consumatore.

## **ABSTRACT**

Organochlorine compounds (OCs) are endocrine disruptors that is compounds that impair the normal functioning of the endocrine system of both animals and humans. Among OCs, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides are indicated as responsible for a lot of toxic effects in humans and wildlife, such as teratogenicity, cancer, reproduction disorders and immunotoxicity. Several authors reported that more than 90% of human exposure to OCs occurs mainly via consumption of foods of animal origin, in particular, milk (and milk dairy products) and sea products. These foods are considered indicators of the environmental pollution by OCs and shall be taken into account in the toxicological risk evaluation for the consumer.

In a first part, the present study aimed at investigating whether waste of urban and industrial origins may be responsible for food contamination by PCBs. In doing so, we compared PCB concentrations in goat's milk from three different towns of Campania region (Italy). One of the three, namely Caserta, together with its surrounding territory in the centre-north of the region has long suffering from the activity of the so-called Ecomafia. The

other two towns, which are part of two different provinces in the south-east of Campania, allowed to create the control group of goats with characteristics very similar to those of the group of main interests. We relieved very high PCB concentrations in milk from Caserta (the sum of the six indicator PCBs and the PCB 118 amounted to 209.10 ng/g on lipid weight) in contrast to the almost total absence of such pollutants in milk from the control group. The study makes clear the relationship between contaminated sites for illegal dumping of waste and contamination by PCBs. The problem it raises must be considered of priority in both the environment and health domain.

At the same time, we also found higher values of lipid content in milk from the control group and a negative relationship between lipid content and PCB concentrations across observations from Caserta.

In the second part of the thesis, a sample of Mediterranean trouts (*Salmo trutta*) collected in Sila national park (Calabria region) was analysed. The contents of PCB and organochlorine pesticides in muscle of trout as well as those in goat milk were determined by a gas-chromatograph equipped with a  $^{63}\text{Ni}$  electron capture detector.

It was observed the presence of PCBs residue levels in the muscle of the specimens (the sum of the six indicator PCBs amounted to 201.9 ng/g on lipid weight on average) and p,p,DDE, the main DDT metabolite, (97.57 ng/g on lipid weight) in the 100% of the sample.

The analysis of correlation between OC concentration levels and intestinal parasites did not show an association between the two variables.

About the toxicological risk evaluation, PCB concentrations detected in Caserta goat milk were above the current European maximum residue limit fixed by the EU, posing a serious health risk for consumers. OC levels found in the trouts from the Calabria, were always below the limits.

In conclusion, the study reveals the usefulness of using goat milk and muscle of trout to evaluate the state of the environmental pollution by OCs and the risk for the consumer.

## **Introduzione**

L'immissione nell'ambiente di molecole sintetiche organoalogenate quali i contaminanti organici persistenti o POPs (Persistent Organic Pollutants) ha assunto dimensioni crescenti da ormai mezzo secolo, con conseguenze purtroppo in molti casi irreversibili.

Tra i composti organoclorurati i bifenilipoliclorurati (PCB) hanno avuto per decenni svariate applicazioni. Le diverse fonti ne hanno determinato il rilascio diretto o indiretto nell'ambiente anche in conseguenza di un loro non idoneo smaltimento associato a incendi e combustioni incontrollate (soprattutto di rifiuti di origine urbana e industriale). Queste pratiche inappropriate hanno costituito, negli ultimi anni una fonte in più di inquinamento per quei territori che da decenni soffrono la piaga del controllo illegale dello smaltimento dei rifiuti come in Italia la regione Campania.

I pesticidi organoclorurati (POC) sono stati anch'essi ampiamente adoperati nel passato per il controllo della diffusione di agenti infestanti (in particolare insetti e ectoparassiti) che minacciano la salubrità delle derrate alimentari e la salute umana e animale. Vanno ricordati, infatti, i benefici ottenuti con il loro uso ad esempio nel controllo della malaria in Africa, in Medio Oriente e in Asia operato attraverso l'eliminazione del flebotomo vettore del plasmodio della malaria (Dhiman *et al.*, 2016).

L'evidenza degli effetti negativi indotti da tali contaminanti sull'ambiente si è spesso manifestata solo dopo il loro uso smisurato e la loro distribuzione indiscriminata su scala globale. Risale, infatti, soltanto alla fine degli anni '50 l'acquisizione della consapevolezza dei problemi legati

all'impatto ambientale dovuto a queste sostanze. A partire dagli anni '60, sono stati, quindi, profusi numerosi sforzi nell'attività di ricerca tesa all'acquisizione di più approfondite conoscenze delle caratteristiche chimico-fisiche e comportamentali e, soprattutto, degli effetti indotti dalla esposizione a tali inquinanti nelle specie viventi. Contemporaneamente, sono stati avviati studi di monitoraggio volti a quantificare i livelli di contaminazione raggiunti nei diversi ecosistemi.

La crescente sensibilità nei confronti di tali problematiche da parte del mondo scientifico è stata affiancata dalla emanazione di leggi e norme da parte dell'autorità competenti, finalizzate alla limitazione della loro diffusione ambientale. Ne sono stata testimonianza nell'ultimo ventennio, le sempre più severe restrizioni all'uso ed alla produzione e l'adozione di attente misure di controllo e prevenzione. Il problema ha assunto ormai notevole rilevanza, in quanto i composti organoclorurati in genere, oltre ad essere caratterizzati da elevata persistenza sono soggetti a fenomeni di diffusione ambientale su largo raggio con il raggiungimento di luoghi lontani anche migliaia di chilometri dalle sorgenti d'inquinamento. Questo fenomeno spiega ad es. gli alti livelli residuali di PCB riscontrati in aree geografiche dove sono scarse le fonti primarie di tali composti (come le zone artiche). La situazione appare ancora più complessa se si considera che, mentre nei Paesi industrializzati sono ormai da tempo in atto severe misure a limitare la presenza dei contaminanti in questione, in quelli in via di sviluppo se ne fa ancora ampio impiego (è il caso ad esempio dell'insetticida DDT), contribuendo all'inquinamento degli ecosistemi viventi. Ciò costituisce una minaccia diretta ma anche indiretta ai danni

della salute delle specie animali esposte come anche di quella degli uomini, consumatori di alimenti di origine animale.

I PCB e i POC sono responsabili di diversi effetti tossici evidenziati sia negli uomini che nelle specie animali domestiche e selvatiche, come teratogenicità, cancro, disturbi riproduttivi e immunotossicità. Particolare attenzione si sta ponendo, negli ultimi anni, all'esposizione umana attraverso il consumo di alimenti. Infatti, se l'esposizione per motivi occupazionali riveste un ruolo solo marginale, l'introduzione preponderante di contaminanti organoclorurati (OC) in genere avviene attraverso la dieta e principalmente attraverso l'assunzione di alimenti di origine animale. Tra questi, un ruolo di primo piano è stato negli ultimi anni, conferito al latte e prodotti derivati insieme ai prodotti della pesca (Malish e Kotz, 2014).

Per quanto concerne in maniera specifica i PCB, la comunità scientifica internazionale ha per decenni dedicato la propria attenzione ai congeneri diossino-simili trascurando i non diossino-simili caratterizzati da una accertata minore tossicità per gli organismi esposti. Solo negli ultimi anni si è verificato un cambio di tendenza in quanto è stato appurato l'alto potenziale di pericolosità dei PCB non diossino-simili che, seppure meno dannosi dei diossino-simili, risultano maggiormente diffusi e a livelli di concentrazione superiori di alcuni ordini di grandezza compensando la minore tossicità con una maggiore presenza ambientale. A dimostrazione di una passata carente attenzione della comunità scientifica a riguardo, basti pensare che solo alla fine del 2011 sono stati stabiliti specifici limiti



massimi residuali concernenti questi congeneri nella Regolamentazione Europea (Regolamento della Commissione EU No 1259/2011).

A tutt'oggi come sottolineato recentemente da Organizzazioni internazionali deputate alla tutela della sicurezza alimentare quali l'EFSA, nonostante in alcune aree geografiche del pianeta si evidenzino una sensibile riduzione dei livelli di contaminazione, sono ancora indispensabili e auspicabili gli studi di monitoraggio della presenza ambientale e quindi dell'esposizione degli organismi viventi agli OC (soprattutto attraverso l'assunzione di alimenti) (EFSA Journal, 2012).

- Dhiman S., Yadav K., Rabha B., Goswami D., Hazarika S., Tyagi V., 2016. Evaluation of Insecticides Susceptibility and Malaria Vector Potential of *Anopheles annularis* s.l. and *Anopheles vagus* in Assam, India. Plos one 11, 1-13.
- EFSA 2012. Scientific Report OF Efsa, Update of the monitoring of levels of dioxin and PCBs in food and feed. The EFSA Journal, 10, 1–82.
- Malisch R., Kotz A., 2014. Dioxins and PCBs in feed and food--review from European perspective.

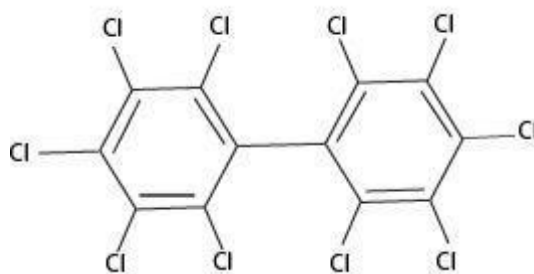
## **Parte prima**



## 1.1 Proprietà chimico-fisiche e impiego

### 1.1.1 Policlorobifenili

I bifenilipoliclorurati (PCB) sono composti non polari caratterizzati dalla presenza nella loro molecola di un nucleo bifenilico a cui si lega un numero variabile da 1 a 10 di atomi di cloro (Fig.1-1). Essi vengono ricavati a partire dal petrolio e dal catrame, dai quali si estrae il benzene, che viene trasformato in bifenile e successivamente clorurato a policlorobifenile.



*Fig. 1-1 Struttura chimica generale dei bifenilipoliclorurati*

Tale struttura consente che i PCB costituiscano una famiglia di ben 209 congeneri, distinti in relazione al diverso numero di atomi di cloro (da 1 a 10) e alla variabile disposizione degli stessi nella struttura bifenilica. Al fine di rendere più agevole l'identificazione di ogni singolo congenere dal punto di vista chimico, sono state proposte nel corso degli anni diverse classificazioni; la più utilizzata, attualmente, è quella di Ballschmiter e Zell (1980) che assegna un numero progressivo da 1 a 209 ai singoli

congeneri a seconda del minor o maggior grado di clorurazione (Pavan et al., 2003). Le caratteristiche fisico-chimiche dei congeneri dei PCB variano quindi notevolmente e questa variabilità ha dirette conseguenze su persistenza, bioaccumulo e tossicità dei singoli congeneri.

Sulla base della loro configurazione strutturale, i PCB sono suddivisi in due gruppi in relazione alla diversa possibilità che hanno gli atomi di cloro di disporsi o meno sullo stesso piano. Pertanto, solo 12 dei 209 congeneri di policlorobifenili vengono definiti coplanari, i cosiddetti PCB diossino-simili o dioxine-like (PCB-DL); i restanti PCB, non coplanari sono invece detti non diossino-simili (PCB-NDL). Nell'ambito del sottogruppo di PCB-NDL la comunità scientifica internazionale ha identificato sei congeneri "indicatori" cioè maggiormente presenti nelle varie matrici ambientali e alimentari studiate e quindi rappresentativi del grado di contaminazione da PCB.

Tutti i congeneri sono poco solubili in acqua e altamente solubili nei lipidi (proprietà direttamente correlata al grado di clorurazione) e in solventi organici quali alcol, acetone ed olio. L'elevata lipofilia, associata alla struttura chimica complessa, li rende difficilmente biodegradabili e ne favorisce il bioaccumulo (Pizzin et al., 2006). Sia i congeneri coplanari che non coplanari sono molto stabili alle variazioni di pH, alla fotodegradazione e all'ossidazione, sono resistenti ad acidi ed alcali e sono ignifughi.

Anche grazie alle loro doti di stabilità chimica, scarsa volatilità, termoresistenza, e non ultime proprietà ignifughe e di isolanti elettrici, sin dagli inizi del XX secolo i PCB sono stati impiegati in numerosi campi sia

in sistemi “chiusi” che “aperti” (Tabella 1). A seguito della scoperta della pericolosità di questi composti, la loro produzione è stata limitata sempre più fino a giungere al divieto d’uso, che in Italia ha prima coinvolto i soli sistemi chiusi per poi estendersi anche a quelli aperti, bandendo così completamente negli ultimi anni l’uso dei PCB e regolamentando lo smaltimento delle apparecchiature esistenti contenenti nei propri circuiti di funzionamento tali composti. (D.Lgs 209/99).

*Tab. 1–1. Utilizzo dei PCB nei sistemi aperti e chiusi*

|                |                                  |  |
|----------------|----------------------------------|--|
| Sistemi chiusi | Olio                             | Per trasformatori: centrali termoelettriche, navi, industrie, edifici, treni, metropolitane, tram, generatori, televisori, ecc.<br>Per condensatori: centrali, industrie, forni elettrici, navi, motori, lampade a mercurio e fluorescenti, apparecchi telegrafici, lavatrici, frigoriferi, condizionatori d’aria, televisori, elaboratori elettronici, ecc. |
|                | Altri usi                        | Cavi elettrici, trivelle, ecc.   |
|                | Conduttore di calore             | Apparecchi per riscaldamento e raffreddamento  |
| Sistemi aperti | Olio lubrificante                | Apparecchiature operanti ad alta temperatura, alta pressione, sott’acqua, pompe ad olio, compressori   |
|                | Elasticizzante                   | Colle, vernici, grassi sintetici, asfalto, inchiostri per stampe   |
|                | Elasticizzante ed isolante       | Guaine per conduttori di elettricità, nastri isolanti, altri usi in campo elettrotecnico   |
|                | Elasticizzante ed antinfiammante | Fibre sintetiche, plastiche, gomme.  |
|                | Carte                            | Carte autocopianti, carte carbone, carte per fotocopie   |
|                | Altri                            | Tinture per carte, tessuti, vernici per metalli, additivi per anticrittogamici, coloranti per vetro e ceramiche, antipolvere, antiossidanti per fusibili, additivi per petrolio, additivi per fertilizzanti  |

### 1.1.2 Pesticidi Organoclorurati

I pesticidi organoclorurati rappresentano un eterogeneo gruppo di composti di sintesi arilici, carbociclici o eterociclici (Figura 2), non polari

e caratterizzati da elevata solubilità nei solventi organici e nei lipidi, scarsa o nulla idrosolubilità, notevole stabilità chimica e quindi lenta o lentissima degradabilità.

In linea generale possono essere suddivisi in cinque gruppi: derivati del difeniletano (DDTs), derivati del cicloesano o stereoisomeri dell'esaclorocicloesano (HCHs), ciclodieni e simili, toxafene e relativi composti, derivati ciclobutapentalenici (mirex e clordecone).

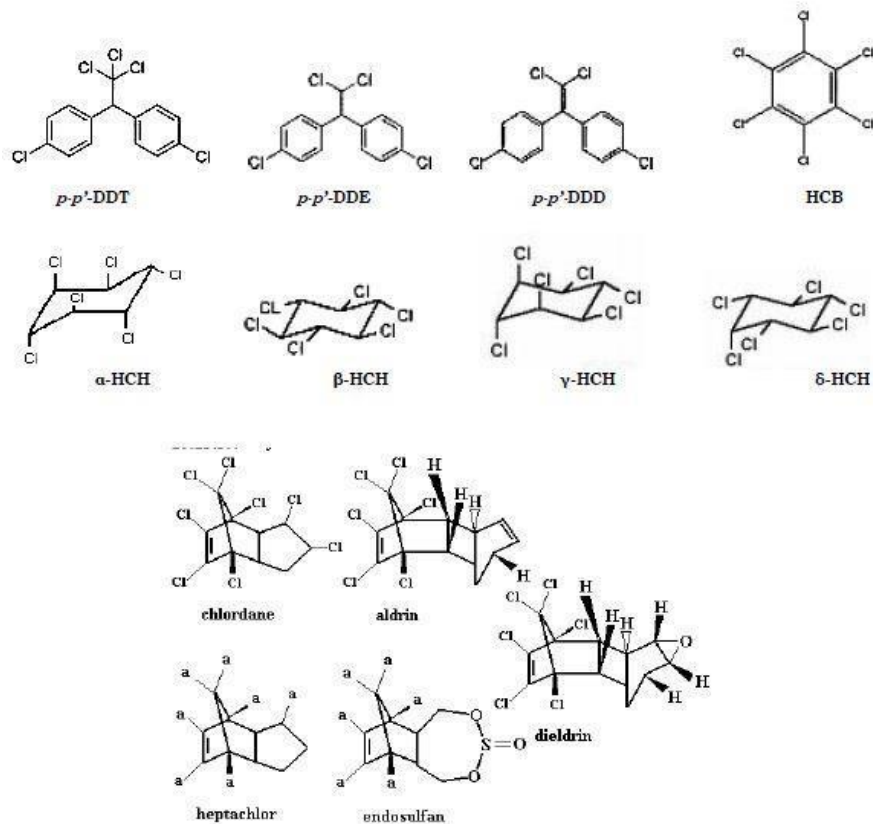


Fig. 1-2. Strutture chimiche dei principali pesticidi organoclorurati



In passato tali composti sono stati largamente utilizzati in ambito agro-zootecnico e medico-sanitario; attualmente l'impiego di questi pesticidi, è vietato in varie parti del mondo, anche se in Paesi sottosviluppati si continuano ad adoperare per la loro particolare efficacia ed i bassi costi di produzione.

Il DDT o diclorodifeniltricloroetano, considerato il capostipite degli insetticidi organoclorurati, è stato sintetizzato già alla fine dell'800. Esso origina dalla condensazione della tricloroacetaldeide con il clorobenzene; è altamente solubile nei solventi organici apolari, insolubile in acqua ed è caratterizzato da una bassa pressione di vapore ( $1.5 \times 10^{-7}$  mm Hg a 20°C). Il composto tecnico è costituito da una miscela di vari isomeri e derivati (p,p'-DDT 77.1%, o,p'-DDT 14.9%, p,p'-DDD 0.3%, o,p'-DDD 0.1%, p,p'-DDE 4.0%, o,p'-DDE 0.1%) ed altri composti non identificati (3.5%).

Inizialmente impiegato da insetticida come presidio per la protezione da malattie trasmesse all'uomo da insetti vettori, successivamente è stato largamente utilizzato per la protezione dei raccolti in agricoltura e nella lotta agli insetti nocivi in ambito domestico. A seguito della comparsa dei primi fenomeni di resistenza negli insetti e per limitare la presenza di residui negli alimenti, sono state introdotte le prime norme restrittive, ma solo alla fine degli anni '60 ne sono stati evidenziati il notevole impatto ambientale e le gravi ripercussioni sulle specie selvatiche.

Anche l'esaclorocicloesano (HCH) tecnico è in effetti una miscela di 8 isomeri, dei quali soltanto gli isomeri  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - ed  $\epsilon$ -HCH, caratterizzati dalla tipica conformazione "a sedia", sono stabili e comunemente

identificati; nel composto tecnico sono inoltre presenti anche piccole quantità di eptaclorocicloesano ed ottaclorocicloesano. Dalla miscela tecnica in seguito a purificazione si ottiene il lindano, ossia il  $\gamma$ -HCH puro al 99% a cui è attribuita la quasi totale attività insetticida. Il lindano è un composto cristallino inodore, molto stabile al calore e caratterizzato da un'elevata tensione di vapore ( $9.4 \times 10^{-6}$  mm Hg a  $20^\circ\text{C}$ ), che lo rende particolarmente adatto ad essere utilizzato sotto forma di vapore.

L'HCH è stato adoperato, per la prima volta, durante la I guerra mondiale come bomba fumogena e le sue proprietà insetticide sono state scoperte solo nel 1942.

I derivati ciclodienici che comprendono l'aldrin, il dieldrin, l'endrin, il clordano, l'endosulfan e l'eptacloro, sono composti altamente clorurati che presentano all'interno dell'anello benzenico il gruppo  $-\text{CH}_2$  clorurato a  $-\text{CCl}$ , ed originano per condensazione dell'esaclorociclopentadiene con idrocarburi ciclici a 5 o 7 atomi di carbonio.

L'aldrin è un solido cristallino caratterizzato da pressione di vapore pari a  $6 \times 10^{-6}$  mm Hg a  $25^\circ\text{C}$ , ed analogamente al suo derivato dieldrin e all'eptacloro, è stato impiegato prevalentemente contro gli insetti presenti nel suolo (termiti, cavallette e larve), verso i quali è attivo sia per contatto che per ingestione. Pur non essendo fitotossico, esso può conferire odore particolare ad alcuni prodotti coltivati su terreni trattati. L'aldrin viene rapidamente ossidato a dieldrin dai batteri presenti nel suolo, dagli insetti, dalle piante e dai vertebrati superiori. Questo secondo composto possiede una pressione di vapore pari a  $1.8 \times 10^{-7}$  mm Hg a  $25^\circ\text{C}$ , e in taluni Paesi tropicali trova ancora impiego per la lotta a malattie trasmesse da

artropodi, come la malaria. L'endrin è invece uno stereoisomero del dieldrin, caratterizzato da pressione di vapore pari a  $2 \times 10^{-7}$  mm Hg a 25°C e da elevata tossicità; il principale impiego è stato nella protezione dei raccolti di cotone e grano, ma è stato anche adoperato su terreni incolti contro le cavallette e sugli orti per il controllo dei topi.

Il primo composto ciclodienico ad essere commercializzato è stato il clordano, adoperato contro formiche e termiti, mentre l'endosulfan, ultimo tra questi pesticidi ad essere stato vietato in Europa, è adoperato nella lotta contro mosche, afidi e cicaline.

Altro pesticida clorurato largamente impiegato nel passato è l'esaclorobenzene (HCB), composto che si presenta in cristalli aghiformi di colore bianco, praticamente insolubile in acqua e caratterizzato da elevata tensione di vapore ( $1089 \times 10^{-5}$  mm Hg a 20°C). L'HCB è stato utilizzato come fungicida per il controllo dei depositi di semi di frumento e di grano. Attualmente, a seguito dei provvedimenti di divieto di produzione e di importazione adottati negli Stati Uniti e delle severe misure restrittive adottate dagli altri Paesi, misure rese necessarie a seguito delle evidenze acquisite sulla sua epatotossicità e cancerogenicità, il suo impiego è fortemente diminuito anche se viene ancora utilizzato come additivo nella composizione di materiale pirotecnico, come prodotto secondario nella lavorazione della gomma sintetica e nella produzione di coloranti.

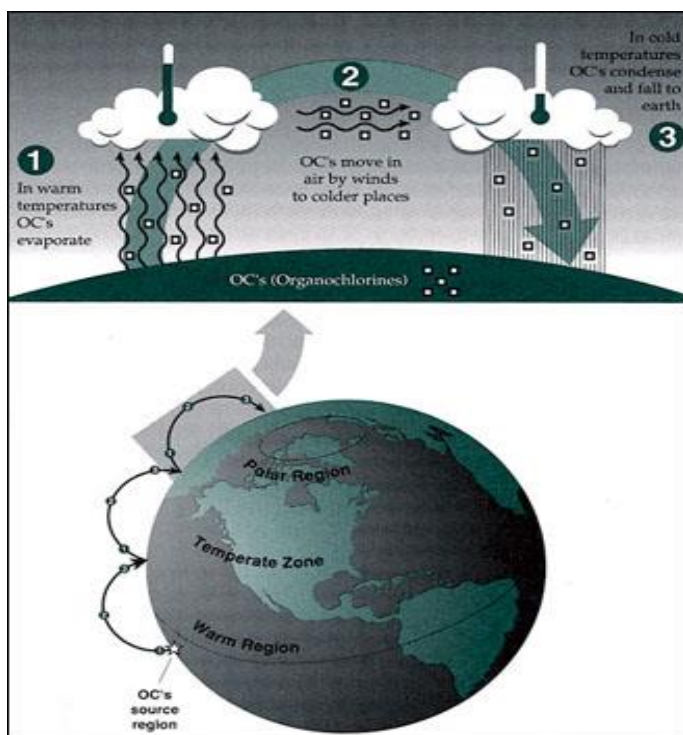
Esso si forma anche come prodotto secondario nella produzione industriale di un gran numero di sostanze chimiche clorurate quali il pentacloronitrobenzene, il tri- e il tetra-cloroetilene, il tetracloruro di

carbonio, i clorofenoli, alcuni pesticidi clorurati come il dacthal ed un numero imprecisato di altri cloroderivati.

Tutti questi composti, una volta dispersi nell'ambiente, risultano abbastanza refrattari alla degradazione, soprattutto se diretti alla litosfera e ciò comporta tempi di emivita decisamente lunghi, ad esempio: 3-10 anni per il DDT, 2 anni per il lindano, 1-4 anni per l'aldrin, 1-7 anni per il dieldrin, ecc. Inoltre, essi vengono facilmente assorbiti dall'apparato radicale delle piante, nelle quali possono essere rinvenuti anche a distanza di anni dall'ultimo trattamento del terreno.

## 1.2 Destino dei contaminanti clorurati nei comparti ambientali

Lo studio del destino ambientale dei composti di sintesi è fondamentale per la valutazione del rischio ecologico; infatti, per quantificare l'entità dell'esposizione ad un contaminante è indispensabile conoscerne le concentrazioni nei diversi comparti. Le molecole organiche, una volta introdotte nell'ambiente, subiranno spostamenti dal punto di emissione verso la loro destinazione finale, ossia verso quel comparto ambientale per il quale mostrano maggiore affinità. Tale affinità dipende dalle caratteristiche del comparto ambientale e dalle proprietà fisico-chimiche delle molecole considerate: peso molecolare, densità, punto di fusione e d'ebollizione, solubilità in acqua o in altri solventi organici, tensione di vapore e coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ( $K_{ow}$ ). Sebbene i livelli ambientali più elevati di POPs siano generalmente riscontrati in prossimità dei punti di rilascio, queste sostanze sono ormai ubiquitarie perché in virtù della loro semivolatilità, vengono trasportate tramite fenomeni di circolazione aerea o acquatica, attraverso gli ecosistemi, contaminando aree anche molto distanti dai luoghi d'emissione (Farrington et al., 1991; Cincinelli et al., 2016). Tale fenomeno è detto *Long Range Transport* ed è la causa principale della contaminazione globale (Figura 3).



*Fig. 1-3. Schema dei principali meccanismi di trasporto e destino globale dei contaminanti organici persistenti.*

Una volta rilasciato nell'ambiente, il contaminante può entrare in ciascuno dei quattro comparti: nell'atmosfera per evaporazione, nella litosfera per adsorbimento, nell'idrosfera per dissoluzione o nella biosfera per assorbimento cutaneo, inalazione o ingestione.

I contaminanti clorurati tendono a localizzarsi prevalentemente nel suolo e nei sedimenti, che possono costituirne un vero e proprio serbatoio e verso i quali presentano un'alta affinità (Wania et al., 1996; Wang al., 2014). Infatti, a tale livello essi si legano col materiale organico, unico costituente apolare e idrofobo ivi presente. Nel caso del DDT e del DDE il terreno ed i

sedimenti tendono a contenere oltre il 99,5% del carico immesso negli ecosistemi. Nel suolo, i contaminanti organoclorurati vanno incontro a processi di degradazione operata principalmente da microrganismi e, in misura minore ed in condizioni particolari, da reazioni chimiche e fotochimiche. Tuttavia, a causa della complessa e stabile struttura delle molecole in oggetto, dell'alto grado di clorurazione e dell'eventuale adsorbimento ai sedimenti, le reazioni degradative sono decisamente lente. Il p,p'-DDT ad esempio è rapidamente declorurato, dalle alte temperature e dalla luce, in p,p'-DDE e p,p'-DDA, e analogamente l'o,p'-DDT è convertito in o,p'-DDE; il p,p'-DDE, però, una volta formatosi non subisce ulteriori degradazioni in anaerobiosi, permanendo nell'ambiente molto più a lungo rispetto al suo precursore. Tale condizione è alla base dell'utilizzo del rapporto DDE/DDT per stabilire il momento presunto dell'immissione del pesticida nell'ambiente: un rapporto inferiore ad uno, infatti, sarebbe indicativo di un utilizzo recente del pesticida (Bordajandi et al., 2003). Analoghi processi di declorurazione possono inizialmente avvenire anche a carico degli isomeri dell'HCH mentre per i ciclodieni sono più comuni le reazioni di ossidazione con formazione di derivati epossido, dotati spesso di maggiore tossicità rispetto ai composti parentali (come ad esempio avviene con la trasformazione dell'aldrin in dieldrin) (Lichtenstein e Schultz., 1960; Buser et al., 2009).

Ad alte temperature gli OC tendono a volatilizzare verso l'atmosfera mentre a basse temperature tendono ad accumulare sulle superfici ambientali. Di conseguenza, gli OC tendono a volatilizzare dalle regioni temperate e tropicali e a condensare nelle regioni più fredde, come i poli o

le grandi catene montuose, attraverso una serie di cicli di condensazione e deposizione (Wania e Mackay., 1996; Cincinelli et al., 2016).

La distribuzione spaziale dei POPs in genere a lungo termine riflette quindi le differenze di temperatura presenti nelle diverse regioni del globo: le condizioni ambientali presenti nelle regioni più fredde favoriscono l'assorbimento dei POPs sul particolato atmosferico, la loro condensazione sul suolo, sull'acqua, sul ghiaccio e il loro assorbimento da parte della vegetazione. Inoltre, a basse temperature i fattori ambientali che potrebbero avere qualche effetto sulla degradazione dei POPs sono meno efficaci, favorendo quindi il loro accumulo. Questo processo di alternata volatilizzazione e condensazione anche chiamato "effetto cavalletta", può condurre i contaminanti a migliaia di chilometri di distanza in pochi giorni.

Le maggiori concentrazioni atmosferiche di composti organoclorurati si riscontrano comunque nei pressi dei centri urbani e delle aree industriali, con livelli più elevati nell'emisfero settentrionale del globo, rispecchiando la situazione di minore sviluppo agricolo e industriale dell'emisfero meridionale. Gli OC tendono, riversati negli ecosistemi, ad andare incontro a fenomeni di bioaccumulo che si verificano per bioconcentrazione o biomagnificazione. La bioconcentrazione è un fenomeno di arricchimento di una sostanza che negli animali avviene attraverso le stesse superfici che consentono gli scambi di gas respiratori (branchie, pelle, polmoni). Mentre la biomagnificazione è un arricchimento che si verifica per via alimentare (Bacci e Gaggi., 1998; Loflen, 2013). In base a quest'ultimo fenomeno i composti, e in particolare i congeneri dei PCB maggiormente clorurati, tendono a raggiungere concentrazioni più elevate man mano che si sale



lungo la catena trofica. Pertanto, i livelli di contaminazione maggiori si rinvencono negli organismi che si collocano all'apice della piramide alimentare. L'età dell'animale, il gradino della catena trofica di appartenenza, la durata e le modalità di esposizione oltre alle specifiche capacità metaboliche sono i principali fattori che influenzano il processo di bioaccumulo negli organismi viventi. Gli OC depositandosi sotto forma di particolato nel suolo e sulla vegetazione sono ingeriti da erbivori intenti al pascolo. La diretta conseguenza è il progressivo accumulo di questi inquinanti nei tessuti di deposito e la loro escrezione nel latte associati alla componente lipidica.

Relativamente all'ambiente acquatico, anche qui la geofase delle acque profonde gioca un ruolo importante, potendo fungere da serbatoio dei POPs (Froescheis et al., 2000) che, grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche, si distribuiscono sia nei comparti abiotici che in quelli biotici. Di conseguenza la ricerca di questi contaminanti negli ecosistemi acquatici riveste notevole importanza, sia per una valutazione complessiva dell'impatto ambientale, sia per analizzare il rischio tossicologico per le specie animali marine e per quelle che di essi si nutrono, incluso l'uomo. Nello svolgere tali studi va presa in considerazione anche la natura del sistema esaminato. Infatti, mari chiusi, come il Mediterraneo, o sistemi fluviali e d'acqua dolce, sono soggetti a fonti di contaminazioni sia locali che remote, e sono meno esposti ai fenomeni di diluizione, dispersione e decadimento che possono invece avvenire ad esempio negli oceani. Tali considerazioni portano a sostenere che in tali sistemi acquatici i contaminanti risultano più a lungo disponibili all'assorbimento da parte degli animali. A conferma di tali asserzioni ci sono diversi studi di

monitoraggio, effettuati soprattutto lungo le fasce costiere, che mostrano la presenza di elevati livelli di contaminazione della fauna ittica locale (Naso et al., 2005; Ferrante et al., 2007, 2010, 2016).

## 1.3 Cinetica

### 1.3.1 Policlorobifenili

In funzione dei coefficienti di ripartizione aria-acqua e ottanolo-acqua e della loro liposolubilità, i PCB sono efficacemente assorbiti attraverso la cute, l'apparato gastroenterico e respiratorio. Una volta assorbiti, essi si legano alle lipoproteine seriche per essere distribuiti ai vari tessuti fino al raggiungimento di un equilibrio dinamico tra concentrazioni plasmatiche e tissutali. In seguito ad esposizione prolungata, tali concentrazioni tendono ad aumentare fino a raggiungere un livello massimo di saturazione, ottenuto quando i meccanismi di escrezione eguagliano la velocità di assunzione. La velocità di raggiungimento di questo livello d'equilibrio è, così, strettamente correlata alle proprietà chimico-fisiche di ciascun composto ed alle capacità metaboliche dell'organismo considerato ed è tanto maggiore quanto minore è la velocità di eliminazione della sostanza in esame (Vighi e Bacci, 1998).

I PCB tendono a distribuirsi ed accumularsi nei tessuti ricchi di lipidi con concentrazioni progressivamente decrescenti in: tessuto adiposo (dal 30% al 70% della quota assorbita), cute e sottocute, fegato, muscolo e sangue (Safe, 1980).

I principali processi metabolici di biotrasformazione avvengono in sede epatica e sono rappresentati in maniera predominante da fenomeni idrossilativi (la cosiddetta "ring hydroxylation"), mediati dalle ossigenasi a funzione mista citocromo P450 dipendenti. La formazione di metaboliti è

fortemente influenzata dal grado di clorurazione degli isomeri. In particolare, avendo un maggior numero di posizioni dell'anello benzenico disponibili all'attacco metabolico, i composti meno clorurati sono metabolizzati più rapidamente dei composti maggiormente clorurati. Tale aspetto si riflette anche nello spettro di composti che si riscontrano lungo una catena trofica: i congeneri meno clorurati subiscono un forte declino fino a scomparire completamente verso i gradini più alti della catena alimentare. Al contrario, i composti più clorurati, essendo più refrattari agli attacchi metabolici, diventano predominanti nelle specie che ne occupano i vertici (Norstrom R.J., 1988; Boon et al., 1992). Di conseguenza, i composti maggiormente clorurati presentano dei valori di clearance ematica senza dubbio più bassi rispetto ai composti con meno cloro-sostituzioni.

L'entità dei processi metabolici, peraltro, è influenzata anche dalle posizioni che gli atomi di cloro occupano sugli anelli benzenici delle molecole. Gli attacchi ossidativi, infatti, non si verificano direttamente sulle posizioni C-Cl, ma tendono ad indirizzarsi sulle posizioni adiacenti non sostituite orto-meta o meta-para dell'anello benzenico.

Oltre a ciò, le posizioni para non sostituite sembrano favorire particolarmente l'idrossilazione catalizzata dal sistema del citocromo P450 (Vallack et al., 1998; Walker, 2001). Tali processi portano alla formazione, mediante epossidi intermedi, di metaboliti idrossilati più facilmente eliminabili con le urine. E' importante da considerare che i PCB possono, inoltre, essere escreti tramite la bile ed il latte, alla cui frazione lipidica si legano (Lutter C. et al. 1998; She J. et al. 1998).

Oltre alla via di escrezione urinaria, quella fecale è senza dubbio la più importante e ad essa contribuisce certamente per la massima parte l'eliminazione biliare. Il grado di escrezione per via biliare è strettamente condizionato dalla lipofilia del composto e, più precisamente, dal suo coefficiente ottanolo-acqua, ed i metaboliti più lipofili vengono eliminati più lentamente. L'entità dei fenomeni di bioaccumulo ed i livelli di "body burden" raggiunti sono influenzati anche da altri fattori, quali età e sesso.

Infatti, le concentrazioni di PCB nei tessuti bersaglio aumentano con l'avanzare dell'età dei soggetti e nei maschi rispetto alle femmine, per il trasferimento in queste ultime di parte del carico corporeo nel latte (Tanabe et al., 1994).

### *1.3.2 Pesticidi Organoclorurati*

Per la loro elevata liposolubilità i pesticidi possono essere assorbiti per inalazione, per contatto cutaneo ma principalmente per via orale, con differenze correlate al composto e alla formulazione. Ad esempio il DDT, sia in polvere che in soluzione, risulta scarsamente assorbito per via cutanea, contrariamente ai ciclodieni ed al lindano. In seguito ad introduzione, questi xenobiotici vengono trasportati nei fluidi organici legati a macromolecole, in particolare alle albumine e alle lipoproteine, raggiungendo tutti i comparti e distribuendosi nei vari tessuti fino allo stabilirsi di un equilibrio dinamico tra siero e organi. Vengono sequestrati principalmente dal tessuto adiposo dal quale si sganciano molto lentamente e, in misura minore, anche da altri tessuti ricchi di lipidi neutri quali fegato, rene e tessuto nervoso. Il motivo di tale distribuzione preferenziale sta, oltre che nella spiccata liposolubilità dei composti clorurati, anche

nella loro struttura chimica e nella tendenza a legarsi a particolari siti presenti in questi tessuti (Yu *et al.*, 2011). Alterazioni nello stato di nutrizione possono comportare una maggiore suscettibilità dell'animale al tossico a causa anche di una minore disponibilità dei depositi di grasso a cui tali composti possano legarsi, e conseguente accumulo degli stessi a livello di tessuti sensibili quali ad esempio quello nervoso. Inoltre, condizioni di stress, di digiuno prolungato o di attività fisica forzata, tramite la liberazione delle catecolamine, efficienti nel provocare un incremento dei fenomeni lipolitici, possono provocare mobilitazione delle quote sequestrate dai tessuti adiposi, con potenziale induzione di fenomeni di tossicità anche acuta. Sono, inoltre, riscontrabili differenze nelle capacità d'accumulo dei vari composti, legate sia a diversa suscettibilità alla metabolizzazione degli stessi, sia a variabilità del corredo enzimatico del soggetto coinvolto. Ad esempio il dieldrin si deposita maggiormente rispetto al suo isomero endrin, più facilmente biotrasformabile proprio per le specifiche caratteristiche strutturali (Bedford *et al.*, 1975) e riscontrabile nei tessuti solo in seguito a intossicazione acuta. La velocità di metabolizzazione dei pesticidi, è influenzata anche dalla specie dell'animale e dal sesso. Esempi in tal senso sono riportati da Kunisue e coll. (2005) che rilevano come la specie canina (principalmente le femmine) sembrasse accumulare in maniera minore rispetto ai felini, pesticidi come il DDT o il clordano, probabilmente grazie ad un corredo enzimatico più specifico nella loro metabolizzazione. La complessa struttura chimica rende, comunque, i pesticidi clorurati difficilmente degradabili,

giustificandone anche la lunga emivita (Tabella 2). La principale sede di biotrasformazione, come per gli altri xenobiotici, è il fegato, anche se può avvenire in minor misura anche in altri tessuti. La fase iniziale è attuata da enzimi microsomiali spesso tramite deidrociorurazione e idrossilazione, con formazione di derivati non sempre meno tossici dei composti parentali; successivamente tali metaboliti possono subire coniugazione con glicina o alanina con l'effetto di un aumento della idrosolubilità.

*Tab. 1-2. Emivita di alcuni pesticidi organoclorurati nel tessuto adiposo e nel latte*

| <i>Composto</i> | <i>Animale</i> | <i>Tessuto</i> | <i>Emivita ( gg )</i> |
|-----------------|----------------|----------------|-----------------------|
| Dieldrin        | bovino-femmina | grasso         | 85                    |
|                 | bovino-maschio | grasso         | 245                   |
|                 | suino          | grasso         | 28                    |
|                 | vacca          | grasso latte   | 30                    |
| DDT             | vacca          | grasso latte   | 14-20                 |
| DDE             | vacca          | grasso latte   | 52                    |

In linea generale, negli animali a sangue caldo il  $p,p'$ -DDT viene dechlorurato a  $p,p'$ -DDD dalla flora gastrointestinale, con formazione intermedia di  $p,p'$ -DDE; il  $p,p'$ -DDD può essere successivamente metabolizzato a  $p,p'$ -DDA e coniugato prima dell'eliminazione (Ecobichon e Sascenbrecker, 1968), mentre il  $p,p'$ -DDE tende ad accumularsi in maniera molto più tenace rispetto al suo precursore e può seguire vie metaboliche differenti. Ciò comporta una maggiore persistenza del DDE nell'organismo, con un aumento della concentrazione dello stesso, espresso in percentuale rispetto ai DDTs, anche a distanza di tempo dall'esposizione al DDT, ed una sua maggiore presenza negli animali al

vertice delle catene alimentari. Proprio in virtù di tale comportamento si ritiene che un basso rapporto DDE/DDT nei tessuti sia indice di una recente esposizione al pesticida (Bordajandi *et al.*, 2003).

Gli isomeri dell'HCH sono trasformati in composti fenolici subendo reazioni di deidroclorurazione, idrossilazione e successiva glucuronazione, ma la velocità di metabolizzazione dell'isomero  $\beta$  risulta inferiore rispetto a quella degli isomeri  $\alpha$  e  $\gamma$ , permettendone un maggior accumulo con fenomeni di biomagnificazione (Abbott *et al.*, 1968). Anche nel caso dei ciclodieni la bioinattivazione risulta lenta e poco efficace, considerando, ad esempio, come l'ossidazione di aldrin ed eptacloro rispettivamente a dieldrin e eptacloro-epossido non alteri significativamente la tossicità o la liposolubilità delle molecole (Keane e Zavon., 1969; Matthews and Matsumura., 1969). Infine l'HCB viene metabolizzato a livello epatico a pentaclorofenolo, pentaclorobenzene e tetraclorobenzene (Mehendale *et al.*, 1975).

La fase escretiva vede coinvolte possibili vie, quale quella biliare (e in minor misura quella fecale) per i composti inalterati o quella urinaria per i loro metaboliti. Parte del processo escretivo può anche attuarsi attraverso le ghiandole sebacee cutanee, con la comparsa di fenomeni di cloracne simili a quelli riscontrabili nell'uomo. La persistenza nell'organismo e la lenta eliminazione di questi xenobiotici può comportare la presenza prolungata di residui nelle derrate di origine animale, e tra queste un certo rilievo va dato al latte. Infatti, la via mammaria costituisce un'altra modalità d'escrezione dei composti clorurati, considerando la notevole vascolarizzazione del tessuto e il contenuto lipidico del latte, che può



quindi contenere livelli anche rilevanti di questi composti lipofili. Come la metabolizzazione, anche l'escrezione risente di una certa variabilità correlata ai composti presi in esame e alle caratteristiche di specie dell'animale coinvolto (Kunisue *et al.*, 2005).

## 1.4 Meccanismo d'azione ed effetti tossici

### 1.4.1 Policlorobifenili

Nonostante i numerosi studi effettuati e tuttora in corso sui bifenilipoliclorurati, non sono ancora completamente noti tutti i loro effetti e i meccanismi tramite cui essi operino. La varietà strutturale dei diversi congeneri ne influenza molto gli effetti, e a ciò è correlabile anche la molteplicità delle azioni tossiche esercitate dalle miscele commerciali, spesso impiegate anche nelle sperimentazioni. Il grado di clorurazione e le posizioni occupate dagli atomi di cloro rivestono grande importanza nel determinismo delle capacità tossiche delle diverse molecole, e in generale si può sostenere che i congeneri a più alto grado di clorurazione, anche per la loro più lunga permanenza nell'organismo e la refrattarietà alle azioni degradative, rivestano un ruolo di maggiore pericolosità. Altra importante distinzione deve essere fatta, per quanto concerne il potenziale tossico, tra i PCB NDL e i PCB DL. Fino a qualche anno fa si attribuiva importanza dal punto di vista tossicologico, principalmente ai DL in quanto questi congeneri risultavano molto più tossici dei primi causando effetti dannosi anche gravi a concentrazioni molto basse (nel range dei ppt). Tuttavia, si è appurato recentemente che i NDL, pur essendo realmente meno tossici (attivi a concentrazioni di ppb), sono molto più presenti nell'ambiente (WHO, 1998) e quindi disponibili per gli organismi animali e l'uomo.

I PCB non inducono una tossicità di tipo acuto. La maggior parte, infatti, sono responsabili di tossicità cronica che comporta alterazioni di molteplici funzioni fisiologiche, inducendo effetti spesso non chiaramente

evidenti e quindi tali da non consentire un adeguato riconoscimento del pericolo, la stima dei livelli residuali e la tossicità da accumulo. Studi di tossicità a breve termine non hanno, infatti, mostrato effetti rilevanti, ma l'esposizione cronica, specie in utero, può interferire anche con lo sviluppo del sistema nervoso e dell'apparato scheletrico (Eriksson et al., 1999; Eriksson et al., 2001). Inoltre va detto che, riguardo alle conseguenze di esposizione prolungata anche a bassi dosaggi di organoclorurati, i mammiferi sembrano più resistenti rispetto a pesci e volatili selvatici, con ripercussioni soprattutto a carico dell'apparato riproduttivo.

Anche i PCB, inoltre, rientrano nel novero degli induttori enzimatici, stimolando soprattutto l'aumentata sintesi di enzimi microsomiali epatici (Goldstein, 1980; Dragney et al., 1995). Infatti, oltre alla già citata possibile attivazione di specifici geni implicati nei meccanismi di differenziazione e moltiplicazione cellulare, si può osservare anche l'induzione di ossigenasi a funzione mista della famiglia del citocromo P450, con conseguente alterazione del metabolismo di svariati ormoni. Tra questi ultimi ritroviamo ad esempio ormoni sessuali, tiroidei e agenti della crescita, ma anche ormoni implicati nei processi immunopoietici (Vos et al., 1980), il cui aumentato catabolismo contribuisce all'azione immunosoppressiva esercitata da questi contaminanti. I PCB sono, infatti, in grado di determinare immunosoppressione sia in specie da laboratorio che in specie selvatiche, comportando una maggiore suscettibilità a infezioni di varia natura. Nell'ambito di tali effetti possiamo riscontrare: atrofia degli organi linfoidei, sia primari che secondari (riduzione ponderale della milza, riduzione numerica dei centri germinativi di milza e linfonodi) (Chang et al., 1982), alterazioni dell'immunità cellulo-mediata (ridotta

attività delle cellule natural-killer e ridotta risposta proliferativa dei linfociti T) (Murphy et al., 2008) e umorale (ridotta risposta anticorpale) (Selgrade, 2007) ridotta attività dei granulociti neutrofili (Ganey et al., 1993).

A carico del sistema riproduttivo sono state riscontrate diverse patologie e disfunzioni, tra cui endometriosi, atrofia, degenerazione e necrosi dei testicoli, riduzione del numero e della vitalità degli spermatoцитi, spesso correlate all'azione ormono-simile (sia estrogeno-simile che anti-estrogenica); a tali effetti consegue una ridotta fertilità o sterilità (Korach et al., 1988; Hombach-Klonisch et al., 2005). Anche in vari uccelli ittiofagi sono stati riscontrati deformità embrionali, ritardi della crescita, ridotto spessore del guscio delle uova e ridotta schiudibilità delle stesse (Gilbertson et al., 1991). Uno studio epidemiologico condotto sull'uomo, ha evidenziato la capacità di alcuni PCB di indurre alterazioni della motilità e della morfologia degli spermatozoi, con differenze nell'attività dei singoli congeneri (Hauser et al., 2003). A questi meccanismi si aggiungono senz'altro le caratteristiche estrogeno-simili e l'induzione del rilascio di GnRH o di ormone luteinizzante dall'ipofisi da parte degli stessi composti. L'azione ormono-simile rientra, assieme alle alterazioni metaboliche dovute ai fenomeni di induzione enzimatica, tra le motivazioni che hanno indotto la comunità scientifica a far annoverare anche questi contaminati tra i cosiddetti “endocrine disrupting compounds”, considerando le interferenze da essi esercitate a livello di svariati sistemi ormonali, tra i quali spiccano quello sessuale e tiroideo.

Le miscele commerciali di PCB, e alcuni congeneri in particolare, sono dotati di attività estrogenica in vivo e in vitro grazie alla capacità di legarsi al recettore ER (estrogenreceptor) (Korach et al., 1988). Alcuni isomeri sono invece in grado di esercitare attività anti-estrogenica (Wojtowicz et al., 2001). I PCB sono anche in grado di legarsi al recettore AR (androgenreceptor), con effetto anti-androgeno e conseguente blocco trascrizionale (Waller et al., 1996). Studi in vitro hanno dimostrato come i bifenilipoliclorurati possano però esercitare azione competitiva ed anti-androgena in presenza di diidro-testosterone, ma si comportino da agonisti in assenza dello stesso (Portigal et al., 2002). Conseguenza di tale comportamento da parte degli xenobiotici in questione è che organi sensibili agli androgeni, come la prostata ed in generale gli organi sessuali maschili, in caso di esposizione in utero, quando sono presenti bassi livelli di ormoni maschili, possono andare incontro ad alterazioni dello sviluppo, come anche può accadere durante lo sviluppo puberale, quando gli ormoni sessuali maschili circolanti danno inizio alla crescita ed al completo sviluppo prostatico. A carico del sistema tiroideo, l'interferenza è esercitata soprattutto da taluni metaboliti idrossilati dei PCB. Tali composti, infatti, sono chimicamente affini all'ormone T4, e competono con questo per il legame con la sua proteina plasmatica di trasporto, la transtiretina (TTR) (Porterfield, 2000) inducendo un'alterazione del turnover ormonale. I PCB inducono anche effetti sulle funzioni neuro-comportamentali, con deficit motorio, iporiflessia, ritardo nell'apprendimento, stati d'ansia e depressione (Boersma e Lanting, 2000), evidenziati in bambini esposti durante lo sviluppo pre-natale o post-natale attraverso il latte materno (Schantz et al., 2003).

Contrastanti sono invece i pareri sulle proprietà cancerogene dei PCB. Secondo studi riportati dall'EPA (Environment Protection Agency degli Stati Uniti) l'esposizione a PCB potrebbe essere correlata ad un'aumentata incidenza di tumori al fegato, alla vescica, alle vie biliari ed ematologici, ma altri studi non hanno permesso di ottenere una così netta connessione tra tali eventi (Brown e Lawton, 1993). Nonostante le conoscenze ancora incomplete sull'argomento, si è arrivati a ipotizzare che i PCB non si comportino da cancerogeni veri e propri ma che fungano da promotori tumorali. Questo avverrebbe soprattutto tramite la loro azione di induttori enzimatici, agevolando l'attivazione di xenobiotici mutageni e cancerogeni, ma anche favorendo la progressione tumorale delle cellule esposte, con differenze comportamentali che dipendono dalla dose, dall'organo bersaglio, dalla miscela di contaminanti, dalla via di somministrazione. In virtù di tante e non sempre concordi testimonianze, la IARC ha ritenuto opportuno indicare i PCB come probabili cancerogeni per l'uomo, inserendoli nella categoria 2A (IARC, 1987 a).

Negli ultimi anni studi in vitro hanno consentito di dimostrare come i PCB NDL siano anche in grado di pregiudicare le funzioni degli adipociti inducendo leptino-resistenza e determinando un conseguente aumento dell'accumulo dei lipidi (Ferrante et al., 2014; Mullerova et al., 2007; Arsenescu et al., 2008). Questo risultato a supporto di quanto solo ipotizzato in studi epidemiologici eseguiti nell'uomo in cui sono stati riscontrati alti livelli di PCB in soggetti obesi dimostra il ruolo dei PCB-NDL nell'insorgenza di patologie metaboliche e quindi nello sviluppo dell'obesità.

#### 1.4.2 Pesticidi Organoclorurati

I POC come i PCB sono implicati soprattutto in episodi di tossicità cronica anche se soprattutto in passato sono stati responsabili di episodi di tossicità acuta. I sintomi dell'intossicazione acuta sono a carico del sistema nervoso sul quale essi agiscono in maniera variabile in relazione alle differenze strutturali dei vari gruppi. Il bersaglio principale ad esempio del DDT è la membrana assonica. Questo composto interferisce con la cinetica dei canali del sodio, ritardandone la chiusura ed inibendo l'efflusso di potassio. Inoltre inibisce le  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPasi e la  $\text{Ca}^{2+}$  -ATPasi, fondamentali nel processo di ripolarizzazione, e il trasporto da parte della calmodulina di ioni calcio, essenziali per la liberazione dei neurotrasmettitori (Matsumura, 1985). Tutto ciò va ad alterare la sensibilità del neurone e quindi tra i sintomi che si manifestano in seguito ad intossicazione acuta ritroviamo tremori, ipereccitazione, convulsioni tonico-cloniche intermittenti di tipo epilettiforme con barcollamenti, opistono e masticazione ma anche salivazione, nausea, vomito, diarrea, midriasi, minzione frequente, aritmie cardiache ed intensa secrezione bronchiale. Durante o dopo gli attacchi epilettici può manifestarsi ipertermia dovuta all'impossibilità di dissipare completamente il calore generato dall'intensa attività muscolare e metabolica. La morte subentra per arresto respiratorio. Nell'ambito del gruppo del DDT e suoi metaboliti, il *p,p'*-DDT ha una bassa tossicità acuta per i mammiferi e nella maggior parte delle specie aviarie, anche se appare molto più pericoloso dei composti derivati e del suo isomero *o,p'*-. Quest'ultimo induce lieve o moderata sintomatologia nervosa anche quando raggiunge a livello

cerebrale concentrazioni 5-9 volte superiori a quelle necessarie al *p,p'*-DDT per produrre lo stesso effetto (Dale *et al.*, 1966).

La tossicità acuta da HCB è relativamente bassa se indotta da un'unica esposizione ma aumenta nel caso di somministrazioni ripetute a dosaggi anche bassi. In quest'ultimo caso la sintomatologia compare dopo qualche settimana dall'esposizione e consiste essenzialmente in perdita di peso, ipereccitabilità, aumento di peso e cambiamenti morfologici del fegato, induzione degli enzimi microsomiali e citoplasmatici, porfiria, fotosensibilità con lesioni cutanee, modificazioni della risposta immunitaria. Talvolta compaiono anche convulsioni, come ad esempio in ratti neonati allattati da madri che avevano assunto il pesticida (De Matteis *et al.*, 1961). Discorso differente agli altri pesticidi va fatto per i ciclodieni, responsabili di svariati casi di intossicazione acuta con esiti fatali e caratterizzati da una rapida insorgenza di fenomeni convulsivi prima di qualsiasi altro sintomo. I ciclodieni inibiscono competitivamente il legame dell'acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA) al proprio recettore causando stimolazione del neurone. Inoltre essi essendo rapidamente assorbiti per via cutanea, rappresentano un rischio anche per coloro che li maneggiano. Come già accennato, l'aldrin viene rapidamente trasformato in dieldrin, quest'ultimo imputabile degli effetti tossici. L'endrin risulta essere il ciclodiene dotato di maggiore tossicità ma risulta poco persistente nei tessuti. L'intossicazione acuta da lindano comporta l'insorgenza di violente convulsioni epilettiformi, che generalmente portano il soggetto a morte entro 24 ore. Il lindano e il dieldrin esercitano un'azione diretta sui tratti dopaminergici della substantia nigra, contribuendo nell'uomo allo sviluppo del morbo di Parkinson (Saeedi Saravi e Dehpour., 2016). In



seguito ad esposizione cronica ai POC invece, possono riscontrarsi perdita di peso, edema, immunotossicità, riduzione del successo riproduttivo, induzione enzimatica, epatotossicità, mutagenicità e promozione tumorale (Ali *et al.*, 2014).

I POC influenzano il sistema immunitario con effetti soprattutto a carico della risposta anticorpale. In uno studio condotto su ratti a cui sono stati somministrati DDT e lindano, per via orale, è stato riportato che tali pesticidi, oltre al deficit anticorpale inducono immunosoppressione in seguito ad una possibile produzione di radicali liberi (Koner *et al.*, 1998). Numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* condotti su animali da laboratorio dimostrano il dieldrin riduce la risposta immunitaria sia umorale sia cellulo-mediata, con soppressione della funzione macrofagica (Krystyniak *et al.*, 1986). Anche per l'HCB è stata confermata l'immunotossicità, con riscontro in particolare di ipertrofia di milza e linfonodi, incremento dei livelli di IgM e lesioni infiammatorie a carico di cute e polmoni imputabili a reazioni autoimmuni indotte dal pesticida (Michielsen *et al.*, 1999).

Da tempo i composti organoclorurati, sono riconosciuti come interferenti endocrini (U.S. EPA, 1994). Tale condizione può indurre vari effetti, ma di sicuro quelli più di frequente riscontrati sono a carico del sistema riproduttivo. Il *p,p'*-DDT e *p,p'*-DDE hanno un'attività tipo anti-androgenica mentre, l'*o,p'*-DDT, il clordano, il dieldrin e il toxafene, estrogeno-simile. Studi *in vivo* mostrano come il *p,p'*-DDE, legandosi ai recettori per gli androgeni, causi riduzione della distanza anogenitale e, nei maschi, ritenzione dei capezzoli e riduzione del volume della prostata (Kelce *et al.*, 1995). Il legame di tipo competitivo dell'*o,p'*-DDT al

recettore per gli estrogeni causa effetti a carico dell'utero come ipertrofia ed edema (Kupfer e Bulger., 1976), ma l'attività ormonale del contaminante pare sia comunque nettamente inferiore rispetto a quella fisiologica dell'estradiolo (Nelson, 1973). Anche il lindano ed il  $\beta$ -HCH sono in grado di esercitare nel topo lieve azione estrogenica (Van Velsen *et al.*, 1986); possono essere inoltre entrambi responsabili di alterazioni a carico dei testicoli con atrofia dei tubuli seminiferi (Huang e Huang., 1987) e degenerazione delle cellule di Leydig (Chowdhury *et al.*, 1987) con possibile calo della produzione di steroidi da parte di tali cellule. Il lindano pare essere anche in grado, di inibire la comunicazione intercellulare e le contrazioni del miometrio in topine gravide tramite perossidazione lipidica (Criswell e Loch-Caruso., 1999). A carico del clordano sono stati rilevati danni ai testicoli ed alterazioni della spermatogenesi (Balash *et al.*, 1987).

Anche il fegato risente fortemente dell'azione dei POC, con alterazioni morfologiche dell'organo e delle sue capacità metaboliche. In animali da laboratorio in seguito ad esposizione al DDT, le prime alterazioni epatiche si sono verificate nelle cellule della regione centrolobulare, con proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio degli epatociti e ipertrofia delle cellule, accompagnata da fenomeni di marginazione e dalla comparsa di piccole gocce lipidiche all'interno del reticolo denominate "liposfere" (Ortega *et al.*, 1956). Il DDT, come molti altri organoclorurati, provoca, inoltre, un aumento della sintesi di fosfolipidi e proteine, tra cui taluni isoenzimi del citocromo P450 e NADPH-citocromo P450 reduttasi (Sonne *et al.*, 2008 b), e sono state rilevate variazioni anche nei livelli serici della fosfatasi alcalina e della alanina-aminotransferasi di cani esposti ai POC

rispetto ad animali di controllo (Backer *et al.*, 2001). Anche l'HCB (Iverson, 1976), i ciclodieni (Hutson e Hoadley., 1974), l'ossi-clordano a basse dosi (Bondy *et al.*, 2003) sono responsabili d'induzione enzimatica. Il DDT, l'HCH, il clordano e il dieldrin in particolare si comportano come induttori di tipo fenobarbitalico (Thorpe e Walker, 1973) mentre sembra che l'HCB appartenga ad una differente classe di induttori che possiedono caratteristiche assimilabili in parte a quelle del fenobarbitale e in parte a quelle del metilcolantrene (Stonard, 1975). L'effetto induttivo di quest'ultimo composto porta ad una aumentata metabolizzazione non solo dello stesso ma anche di altri pesticidi (Mendoza *et al.*, 1976). L'attività dei composti clorurati sul sistema enzimatico epatico può quindi avere ripercussioni sul metabolismo anche di altri xenobiotici, come pure di farmaci e ormoni endogeni, con l'alterazione dei delicati sistemi da essi regolati.

Le alterazioni epatiche possono risultare comunque reversibili qualora l'assunzione dello xenobiotico venga interrotta sufficientemente presto (Wright *et al.*, 1972), anche se la normalizzazione risulta avvenire con una certa lentezza, specie se l'induttore permane a lungo nel tessuto. Se invece l'esposizione ai pesticidi è prolungata e a concentrazioni elevate, il danno risulta irreversibile, anche in virtù di una durata vitale degli animali a volte non sufficientemente lunga da permettere una totale eliminazione del composto e un ritorno alla normale fisiologia dell'organo.

Riguardo le capacità mutageniche, esistono pareri discordanti, ma i test di mutagenicità risultano negativi (Wildemaue *et al.*, 1983). Nello specifico, il DDT, a seguito di test microbiologici, è stato classificato come

non mutageno (Shirasu *et al.*, 1976), mentre test *in vivo* hanno dato risultati negativi o dubbi (Coulston., 1985). Altri test hanno indicato come non mutageno anche l' HCH (Wildemauwe *et al.*, 1983), così come il dieldrin, l'aldrin e l' HCB (UshaRani *et al.*, 1980).

Infine va esaminata la cancerogenicità di questi contaminanti, anche se i pareri in proposito sono talvolta contrastanti e l'azione non sembra diretta. Tali composti, infatti, agirebbero come promotori tumorali e l'effetto sarebbe dovuto all'induzione di stress ossidativo a carico delle membrane cellulari e soprattutto all'induzione enzimatica, che, comportando squilibri ormonali, agevolerebbe l'azione di altre sostanze tumorigene. Il DDT, l'HCH, ed i ciclodieni possono infatti a livello epatico agevolare l'azione cancerogenica di agenti quali la dietilnitrosamina o le aflatossine (Rojanapo *et al.*, 1987).

Per quanto riguarda l'uomo, è stato dimostrato come l'esposizione cronica a tali composti clorurati, possa contribuire alla genesi di cancro in organi come il surrene, l'utero o la tiroide per l'alterazione del metabolismo di ormoni quali estrogeni o tiroxina (Laden *et al.*, 2001). Tuttavia, i risultati non sempre concordi delle sperimentazioni, non permettono ad oggi di definire con certezza le proprietà tumorigene dei pesticidi clorurati, inducendo la IARC (International Agency for Research on Cancer) a classificarne la maggior parte dei POC come possibili cancerogeni per l'uomo (categoria 2B) (IARC, 1987 b-1991-2001).

### *1.4.3 Tossicità nelle specie ittiche*

Le informazioni specifiche circa gli effetti tossici da inquinanti clororganici nelle specie ittiche risultano ancora abbastanza lacunose, mostrando la necessità di eseguire ulteriori studi in merito.

Molte delle ricerche disponibili, comunque focalizzano l'attenzione sulle specie che abitano i fondali, a causa della maggiore possibilità di contatto con i contaminanti presenti nei sedimenti. Le specie di superficie, che dovrebbero presentare livelli di contaminazione inferiori (Froescheis et al., 2000), assorbono gli xenobiotici sia tramite captazione delle molecole in fase di ricaduta verticale, che per biomagnificazione in seguito all'ingestione di organismi contaminati che li hanno assimilati sul fondo.

Vari studi hanno mostrato come il contatto con sedimenti altamente contaminati da PCB e POC si accompagni ad un aumento di patologie del tegumento e una maggiore incidenza di fenomeni teratogeni e tumori (Malins et al., 1985; Payne et al., 1988; MacDonald et al., 2002). Quest'ultimo rilievo potrebbe essere correlato anche all'osservazione della formazione di addotti al DNA a seguito della produzione di metaboliti altamente instabili.

In uno studio condotto su pesci piatti provenienti da una baia Canadese soggetta ad intenso inquinamento, è stata osservata la frequente presenza di lesioni ulcerative a carico del tegumento e necrosi delle pinne (Khan, 2003). A livello branchiale erano rilevabili iperplasia e ipertrofia dell'epitelio delle lamelle secondarie, tendenti a fondersi soprattutto nelle regioni basali, oltre che un maggior numero di cellule mucipare (PAS-positive). Tali riscontri sono probabilmente dovuti anche al più diretto

contatto delle strutture branchiali con i contaminati disciolti nell'acqua. Altro riscontro era l'esistenza di lesioni circolari a livello epatico con marcata epatomegalia. Dal punto di vista istopatologico, tali aree risultavano steatosiche e le cellule apparivano fortemente vacuolizzate, con marginazione del nucleo e in alcuni casi presenza di corpi ialini. Gli epatociti presentavano talvolta ipertrofia nucleare, pleomorfismo, emosiderosi, necrosi aspecifica e fibrosi.

Spesso l'incremento dell'indice epatosomatico dovuto a esposizione a OC è stato associato ad un aumento degli enzimi deputati alla biotrasformazione dei tossici (sistema del citocromo P4501A/EROD) (Melancon et al., 1981; Ankley et al., 1986; Jimenez e Stegeman, 1990), come osservato, ad esempio, in sogliole residenti in aree fortemente contaminate da PCB (Johnson et al., 1993; Khan, 1999) e alcune specie del genere *Salmo* (Jørgensen et al., 2006). Altra considerazione riguardo l'induzione enzimatica provocata da questi composti, è il rilievo che l'espressione del citocromo CYP1A1 pare venga influenzata in maniera differente anche in funzione della via di introduzione dei PCB (Yeung et al., 2003). Lo stimolo dell'attività di questo citocromo a livello epatico è maggiore nel caso di assorbimento tramite la pelle o le branchie, mentre se l'esposizione si verifica per via orale viene principalmente coinvolta la forma intestinale del CYP1A1, confermando l'instaurarsi di una prima importante reazione a livello del canale digerente. Sembrerebbe che le molecole meno clorate provochino un minor effetto induttivo, forse anche per via di un loro minore assorbimento intestinale e una più facile metabolizzazione, cui consegue anche un più limitato accumulo nell'organismo rispetto ai composti a maggior contenuto di cloro.

L'esposizione a livelli elevati di OC è stata anche associata in svariati studi con il riscontro di alte concentrazioni di metaboliti nella bile, inducendo ad ipotizzare il possibile instaurarsi di un ricircolo entero-epatico.

E' stato osservato come pesticidi clorurati quali il lindano siano in grado, sia a livello epatico che muscolare, di alterare il metabolismo glucidico, inducendo una diminuzione delle riserve di glicogeno e un aumento della glicemia (Ferrando e Andreu, 1991). L'interferenza con l'attività di svariati enzimi da parte di alcuni POC (es. DDT e endrin) si ripercuote anche sui meccanismi che regolano l'equilibrio osmotico sia nelle anguille che in altri pesci teleostei, sia marini che d'acqua dolce (Janicki e Kinter, 1971; Kinter et al., 1972). In pesci provenienti da aree particolarmente soggette a contaminazione, è stata indicata, inoltre, l'esistenza di lesioni spleniche e renali con accumuli di emosiderina in aggregati macrofagici (Svobodová et al., 1994; Khan, 2003). In alcuni casi, oltre agli effetti già citati, sono stati anche osservati danni renali quali dilatazione della capsula di Bowmann e ipertrofia glomerulare, e ancora lesioni gastrointestinali (Haensly et al. 1982); il tutto sarebbe conseguenza dell'esposizione cronica a organoclorurati. Un ulteriore comparto che subisce l'interferenza da parte dei composti clororganici è quello riproduttivo. Specie i PCB ad alte concentrazioni, sembrerebbero determinare una ridotta produzione di uova e un calo nella vitalità delle larve (Larsson et al., 1990; van denThillart et al., 2005). Nell'Anguilla europea, legati ai lipidi trasferiti dal muscolo agli oociti si possono riscontrare anche questi contaminanti, in grado di compromettere il successivo sviluppo embrionale (Palstra et al., 2006). I tossici organoclorurati tendono, inoltre, a inficiare il successo riproduttivo di questa specie interferendo con la variabilità genotipica

(Maes et al., 2005). Gli OC esercitano inoltre effetti acuti e cronici sulla cascata tiroidea nei pesci. Tali effetti sarebbero mediati da uno sbilanciamento dei livelli plasmatici di T3 e T4 o dal danno alla struttura dei tessuti tiroidei (ipertrofia e iperplasia della tiroide). A queste alterazioni sarebbero anche indirettamente correlate altre modificazioni funzionali endocrine quali quelle correlate al controllo della attività riproduttiva. L'inibizione della produzione spermatica, la riduzione della produzione di uova, lo sviluppo delle gonadi, la crescita ovarica, l'attività natatoria, la fertilità e l'aumento della mortalità larvale sono alcuni degli effetti osservati. Gli ormoni tiroidei un ruolo chiave nelle fasi di sviluppo e crescita del pesce, soprattutto nei primi stadi vitali, per cui, una deregolazione della funzionalità della tiroide operata dagli OC può inibire la crescita delle larve e delle forme giovanili sia nelle specie selvatiche che in quelle di allevamento contribuendo in modo drastico al declino delle specie (Nugegoda e Kibria, 2016). Infatti, secondo taluni studiosi, l'inefficienza riproduttiva potrebbe essere coinvolta nella contrazione numerica di alcune popolazioni ittiche. Non appare però semplice individuare un chiaro rapporto tra le due cose, intervenendo in tale ambito anche svariati fattori ambientali e meccanismi di regolazione delle popolazioni stesse, i cui effetti sono difficilmente isolabili da quelli dovuti ai tossici. Risulta quindi necessaria molta cautela nell'esprimere conclusioni in merito alle possibili modifiche demografiche nella fauna selvatica unicamente correlate all'esposizione a contaminanti ambientali (Barnthouse et al., 2003).

~~~~~



Come indicato per altre specie, anche nei pesci questi composti inducono immunosoppressione, con un declino delle popolazioni di linfociti circolanti e monociti (Khan, 2003). L'attività di fagociti e linfociti è stata suggerita come buon indicatore dell'immunotossicità da OC nei pesci, ma per la valutazione dell'esposizione cronica a tali composti risulta utile anche il rilievo dell'emosiderosi (anche se di origine aspecifica), dovuta ad un'eccessiva distruzione di eritrociti ed al successivo sequestro negli aggregati di corpi macrofagici.

La depressione del sistema immunitario è stata anche messa in relazione con l'aumento di patologie parassitarie. Esempio in tal senso è stato il riscontro nell'anguilla di una maggiore suscettibilità a infestazioni da nematodi quale l'*Anguillicola crassus* (Sures e Knopf, 2004 a-b; Sures, 2006). Se però nei pesci è stato riscontrato da un lato un aumento dei casi di infestazioni da ecto-parassiti, probabilmente in relazione al calo dell'immunità cellulo-mediata, dall'altro ci sono studi che riportano una minore frequenza di casi di endo-parassitosi in soggetti esposti a DDT e PCB. Quest'ultimo risultato potrebbe essere in parte dovuto all'effetto pesticida degli inquinanti sulle forme larvali dei parassiti o sugli eventuali ospiti intermedi (Marcogliese e Cone, 1997; Vidal-Martinez et al., 2003).

Studi specificamente svolti sulla trota di fiume (*Salmo trutta*) mancano in letteratura per quanto di nostra conoscenza. Alcuni studi effettuati in pesci del genere *Salmo* hanno evidenziato come i PCB trasferiti per via verticale possono alterare la resistenza alle malattie come al *Flavobacterium psychrophilum* (Ekman et al 2004)

## 1.5 Monitoraggio ambientale

Tra i mezzi in nostro possesso per la valutazione delle condizioni di contaminazione e dei suoi effetti sugli esseri viventi, vi è la pratica del monitoraggio ambientale. Questo approccio ha avuto rapido sviluppo pur essendo di origine relativamente recente, e consiste nell'analizzare in maniera sistematica specifiche matrici, con lo scopo di individuare e quantificare la presenza di potenziali contaminanti nei diversi comparti ambientali. Spesso tali analisi si concentrano su un determinato ecosistema, e i dati ottenuti forniscono informazioni sui livelli degli xenobiotici in quel settore, sulle variazioni temporali degli stessi e su eventuali effetti dannosi a carico delle specie viventi di quel sistema.

Fulcro di tale metodica è l'impiego dei cosiddetti "indicatori biologici", organismi che forniscano informazioni sulla qualità dell'ambiente mediante reazioni identificabili di natura biochimica, fisiologica o morfologica. Nel selezionare una specie quale bioindicatore vanno tenuti in conto fattori quale la sensibilità della stessa agli inquinanti sotto studio, per consentire anche valutazioni di tipo qualitative o semi-quantitative sugli effetti indotti. Per le valutazioni di tipo quantitativo, invece, vengono impiegati organismi definibili come bioaccumulatori, che tendano ad accumulare gli inquinanti nei propri tessuti, dopo averli assorbiti dall'ambiente in quantità misurabili. A tali scopi vengono scelte di solito specie che siano dotate di elevata tolleranza ai tossici studiati, e che godano di una vita abbastanza lunga. Infatti, una prolungata durata vitale permetterebbe un maggiore accumulo di contaminanti tramite

bioconcentrazione, biomagnificazione e bioaccumulo. Tali termini indicano rispettivamente fenomeni di arricchimento che si verificano tramite strutture respiratorie (polmoni, branchie, pelle, foglie), tramite la via alimentare, o infine tramite una qualsiasi via (con la respirazione, per ingestione o per contatto).

La biomagnificazione deve essere tenuta in conto specialmente nel momento in cui si valuta il livello trofico della specie esaminata, in quanto, proprio tramite questo fenomeno, contaminanti come gli OC tendono a raggiungere concentrazioni crescenti man mano che si sale nella catena alimentare. Il rapporto tra i livelli del contaminante presente nei tessuti del predatore rispetto a quelli della preda è definito come TTC (Trophic Transfer Coefficient), indice dell'efficacia dei fenomeni di biomagnificazione. Tale indice assume valori crescenti ai gradini superiori della catena trofica, con differenze però anche relative alla tipologia della specie in esame, presentando valori 10 volte inferiori nei predatori marini rispetto ad esempio ai cetacei o agli uccelli ittiofagi. Per composti altamente lipofili e persistenti come POC e PCB, infatti, sin dai primi studi si è notato come i fenomeni d'accumulo nelle catene trofiche marine risentissero molto del differente ruolo rivestito dalle vie respiratorie degli organismi nelle funzioni di assorbimento ed escrezione di tali molecole. Va infatti tenuto conto di come sostanze quali HCB, DDT e PCB raggiungano concentrazioni molto superiori nell'acqua rispetto all'aria in virtù di coefficienti di ripartizione aria/acqua dell'ordine di  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  (a 20°C), e della particolare efficienza dell'apparato branchiale nell'estrarre ossigeno da un ambiente ove la sua concentrazione è circa  $1/27$  di quella nell'aria. I composti organoclorurati, quindi, si ripartiscono passivamente

tra acqua e lipidi dell'organismo, raggiungendo condizioni di equilibrio in tempi piuttosto brevi.

I processi implicati nel fenomeno del bioaccumulo sono comunque molto complessi a causa delle fluttuazioni delle popolazioni, dei rapporti cibo-tessuto, delle capacità metaboliche delle varie specie e di molte altre considerazioni di natura ecologica. I principali fattori in grado d'influenzare l'arricchimento dei contaminanti clorurati negli organismi animali sono: caratteristiche fisico-chimiche della sostanza (Kow, persistenza nell'ambiente, biodegradabilità), capacità della specie considerata di metabolizzare la sostanza, capacità di escrezione, livello trofico della specie, tipo di alimentazione, sesso, età, migrazione e riproduzione.

In linea generale, la scelta di una determinata specie come bioindicatore si basa sul possesso di una serie di requisiti indispensabili:

- accertata capacità di accumulare i contaminanti persistenti o mostrare verso di essi specifiche reazioni;
- ciclo vitale sufficientemente lungo e tale, dunque, da consentire il bioaccumulo dei composti da ricercare;
- resistenza ai composti in esame (es. organoclorurati);
- presenza di concentrazioni tissutali direttamente correlabili a quelle dell'ambiente in cui vive ed a variazioni dei livelli di inquinamento nel tempo;
- ampia e abbondante distribuzione nell'area di studio; o facile identificabilità della specie;

- stanzialità e, quindi, l'essere rappresentativi del sito di prelevamento;
- alimentazione costituita prevalentemente da prede stanziali;
- facile reperibilità in tutte le stagioni;
- "home range" sufficientemente circoscritto.

I primi studi per la valutazione dell'impatto ambientale di contaminanti chimici sono stati condotti sui sistemi acquatici, anche in virtù della presenza in essi di specie che, risentendo maggiormente dell'assunzione per via respiratoria degli xenobiotici, rispecchiavano meglio la situazione di tutta l'area vitale e non solo magari delle zone in cui si alimentavano.

- Abbott D.C., Goulding R., Tatton J.O.G. (1968). Organochlorine pesticide residues in human fat in Great Britain. *Br. Med. J.* 3(5611): 146-9.
- Ali U., Syed J.H., Malik R.N., Katsoyiannis A., Li J., Zhang G., Jones K.C., 2014. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: a review. *Sci Total Environ.* 1, 476-477:705-17.
- Ankley G.T., Blazer V.S., Reinert R.E., Agosin M. (1986). Effects of Aroclor 1254 on cytochrome P450-dependent monooxygenase, glutathione-S-transferase, glucuronosyltransferase activities in channel catfish liver. *Aquat. Toxicol.* 9: 91-103.
- Arsenescu V., Arsenescu R.I., King V., Swanson H., Cassis L.A. 2008 Polychlorinated biphenyl-77 induces adipocyte differentiation and proinflammatory adipokines and promotes obesity and atherosclerosis. *Environ. Health Perspect.* 116: 761–768.
- Backer L.C., Grindem C.B., Corbett W.T., Cullins L., Hunter J.L., 2001. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Sci. Total Environ.* 274, 161-9.
- Balash K.J., Al-Omar M.A., Abdul Latif B.M. 1987. Effect of chlordane on testicular tissues of Swiss mice. *Bull Environ Contam Toxicol.* 39: 434-42.
- Ballschmiter K., Zell M. 1980. Baseline studies of the global pollution. I. Occurrence of organohalogens in pristine European and antarctic aquatic environments. *Int J Environ Anal Chem* 8(1):15-35.
- Barnthouse L.W., Glaser D., Young J. (2003). Effects of historic PCB exposures on the reproductive success of the Hudson River striped bass population. *Environ. Sci. Technol.* 37: 223-8.
- Bedford C.T., Hutson D.H., Natoff I.L. (1975). The acute toxicity of endrin and its metabolites to rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 33: 115-21.
- Bertocchi, L., Ghidini, S., Fedrizzi, G., & Lorenzi, V. (2015). Case-study and risk management of dioxins and PCBs bovine milk contaminations in a high industrialized area in Northern Italy. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22, 9775–9785.
- Boersma E.R., Lanting C.I. 2000. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins. Consequences for longterm neurological and cognitive development of the child lactation. *Adv Exp Med Biol.* 478: 271-87.

Bondy G., Armstrong C., Coady L., Doucet J., Robertson P., Feeley M., Barker M., 2003. Toxicity of the chlordane metabolite oxychlordane in female rats: clinical and histopathological changes. *Food Chem. Toxicol.* 41, 291-301.

Boon L.P., Van Arnheim E.V., Jansen S., Kannen N. 1992. The toxicokinetics of PCBs in marine mammals with special references to possible interactions of individual congeners with cytochrome P450 dependent monooxygenase systems: an overview. In: Walker C.H. and Livingstone D.R. (eds.) *Persistent pollutants in marine ecosystems*. Pergamon Press, Oxford. 119-60.

Bordajandi L.R., Gómez G., Fernández M.A., Abad E., Rivera J., González M.J., (2003). Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere* 53, 163–171.

Brown J.F., Lawton Jr. R.W. 1993. Environmental Protection Agency - PCBs in fish tissue. In *Proceedings: U.S. EPA's National Technical Workshop*. EPA 823-R-93-003.

Caggiano R., Sabia S, D'Emilio M, Macchiato M, Anastasio A, Ragosta M, Paino S. (2005). Metal levels in fodder, milk, dairy products, and tissues sampled in ovine farms of Southern Italy. *Environ Res.* 99(1):48-57.

Carreras-Aubets a, Francisco Esteban Montero b, Aneta Kostadinova c,d, Maite Carrassón (2012). Parasite communities in the red mullet, *Mullus barbatus* L., respond to small-scale variation in the levels of polychlorinated biphenyls in the Western Mediterranean. *Marine Pollution Bulletin*, 64,1853–1860.

Chang K.J., Hsieh K.H., Tang S.Y., Tung T.C., Lee T.P., 1982. Immunologic evaluation of patients with polychlorinated biphenyl poisoning: evaluation of delayed-type skin hypersensitive response and its relation to clinical studies. *J Toxicol Environ Health.* 9, 217-23.

Chowdhury A.R., Venkatakrishna-Bhatt H., Gautam A.K., 1987. Testicular changes of rats under lindane treatment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 154-6.

Cimenci, O., Vandevijvere, S., Gosciny, S., Van Den Bergh, M.A., Hanot, V., Vinkx, C., et al. (2013). Dietary exposure of the Belgian adult population to non-dioxin-like PCBs. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 670–679.

Cincinelli A., Martellini T., Pozo K., Kukučka P., Audy O., Corsolini S., 2016. *Trematomus bernacchii* as an indicator of POP temporal trend in the Antarctic seawaters. *Environ Pollut.* S0269-7491, 30271-2.

Costera, A., Feidt, C., Marchand, P., Le Bizec, B., Rychen, G. (2006). PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay. *Chemosphere*, 64, 650–657.

Coulston F., 1985. Reconsideration of the dilemma of DDT for the establishment of an acceptable daily intake. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 5, 332-83.

Criswell K.A., Loch-Caruso R., 1999. Lindane-induced inhibition of spontaneous contractions of pregnant rat uterus. *Reprod. Toxicol.* 13, 481-90.

Dale W.E., Copeland M.F., Pearce G.W. and Miles J.W., 1966. Concentration of o,p'-DDT in rat brain at various intervals after dosing. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 162, 40-43.

Decreto Ministeriale del 13 Maggio 2005. Aggiornamento del decreto del Ministro della salute 27 agosto 2004, concernente: Prodotti fitosanitari: limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione. G.U. 184 del 9/8/2005.

De Felip, E., Bianchi, F., Bove, C., Cori, L., D'Argenzio, A., D'Orsi, G., et al. (2014). Priority persistent contaminants in people dwelling in critical areas of Campania Region, Italy (SEBIOREC biomonitoring study). *Science of the Total Environment*, 487, 420–435.

De Matteis F., Prior B.E., Rimington C., 1961. Nervous and biochemical disturbances following hexachlorobenzene intoxication. *Nature (London)*. 191, 363-6.

Desiato, R., Bertolini, S., Baioni, E., Crescio, M.I., Scortichini, G., Ubaldi, A., Sparagna, B., Cuttica, G., Ru, G. (2014).

Data on milk dioxin contamination linked with the location of fodder croplands allow to hypothesize the origin of the pollution source in an Italian valley. *Science of the Total Environment*, 499, 248–56.



Di Bella G., Potortì A.G., Lo Turco V., Licata P., Rastrelli L., Dugo G., 2014. Donkey's milk safety: POCs and PCBs levels and infant daily intake. *Food Control* 46, 210-216

Di Fusco, N. (2006). La contaminazione da diossine in provincia di Caserta. *SILVAE*, 4, 225–238.

Diletti, G., Torreti, L., De Massis, M.R., Migliorati, G., Scortichini, G. (2003). A case of milk contamination by PCDD/Fs in Italy: Analytical levels and contamination source identification. *Organohalogen Compounds*, 64, 1–4.

Di Muccio, A., Stefanelli, P., Funari, E., Barbini, D.A., Generali, T., Pelosi, et al., (2002). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in 12 edible marine organisms from the Adriatic Sea, Italy, spring 1997. *Food Additives & Contaminants*, 19, 1148–1161.

Domingo, J.L., and Bocio, A. (2007). Levels of PCDD/PCDFs and PCBs in edible marine species and human intake: a literature review. *Environment International*, 33(3), 397–405.

Dragnev K.H., Nims R.W., Fox S.D., Lindahl R., Lubet R.A. (1995). Relative potencies of induction of hepatic drug-metabolizing enzyme genes by individual PCB congeners. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 132(2): 334-42.

Ecobichon D.J. e Saschenbrecker P.W. (1968). Pharmacodynamic study of DDT in cockerels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 46(5): 785-94.

Ekman E., Akerman G, Balk L, Norrgren L. (2004). Impact of PCB on resistance to *Flavobacterium psychrophilum* after experimental infection of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* eggs by nano-injection. *Dis Aquat Organ.* 60(1):31-9.

Eriksson P., Viberg H. Ankarberg E., Jakobsson E., Örn U., Fredriksson A. 2001. Polybrominated diphenylethers (PBDEs): a novel class of environmental neurotoxicants in our environment. In: Asplund L., Bergman Å., de Wit C., et al. (eds) *Proceedings of the Second International Workshop on Brominated Flame Retardant*. Stockholm. pp. 71-3.

Eriksson P., Viberg H., Jakobsson E., Örn U., Fredriksson A. 1999. PBDE, 2,2',4,4',5- pentabromodiphenyl ether, causes permanent neurotoxic

effects during a defined period of neonatal brain development. *Organohalogen Compounds*. 40: 333-6.

Escareño, L., Salinas-Gonzalez, H., Wurzinger, M., Iñiguez, L., Sölkner, J., Meza-Herrera, C. (2013). Dairy goat production systems: status quo, perspectives and challenges. *Tropical Animal Health and Production*, 45, 17–34.

Esposito, M., Cavallo, S., Serpe, F.P., D'Ambrosio, R., Gallo, P., Colarusso, G., et al. (2009). Levels and congener profiles of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in cow's milk collected in Campania, Italy. *Chemosphere*, 77, 1212–1216.

Esposito, M., Serpe, F.P., Cavallo, S., Pellicanò, R., Gallo, P., Colarusso, G., et al. (2010). A survey of dioxins (PCDDs and PCDFs) and dioxin-like PCBs in sheep and goat milk from Campania, Italy. *Food Additives and Contaminants Part B. Surveillance*, 3(1), 58–63.

FAOSTAT. (2012). <http://faostat.fao.org/site/569/default.aspx>.

Farrington J.W. (1991). Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. *Environ. Health Perspect.* 90: 75-84.

Ferrando M.D. e Andreu E. (1991). Effects of lindane on fish carbohydrate metabolism. *Ecotox. Environ. Saf.* 22: 17-23.

Ferrante MC, Fusco G, Naccari C, Meli R, Clausi MT. ( 2016)Are Biometric Parameters Helpful to Assess the Health Risk of Consuming Organochlorine Compounds Contaminated Silver European Eel (*Anguilla anguilla*)? *J Food Sci.* 81(4):T1024-30.

Ferrante MC., Amero P., Santoro A., Monnolo A., Simeoli R., Di Guida F., Mattace Raso G., Meli R. (2014). Polychlorinated biphenyls (PCB 101, PCB 153 and PCB 180) alter leptin signaling and lipid metabolism in differentiated 3T3-L1 adipocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 279(3):401-8.

Ferrante M. C., Clausi M. T., Meli R., Fusco G., Naccari C., Lucisano A., 2010. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). *Chemosphere.* 78, 709–716.

- Ferrante M.C., Cirillo T., Naso B., Clausi M.T., Lucisano A., Amodio Cocchieri R. (2007). Polychlorinated Biphenyls and Organochlorine Pesticides in Seafood from the Gulf of Naples (Italy). *J. Food Protect.* 70(3): 706-15.
- Froescheis O., Looser R., Cailliet G.M., Jarman W.M., Ballschmiter K. (2000). The deep-sea as a final global sink of semivolatile persistent organic pollutants? Part I: PCBs in surface and deep-sea dwelling fish of the north and south Atlantic and the Monterey Bay Canion (California). *Chemosphere.* 40(6): 651-60.
- Ganey P.E., Sirois J.E., Denison M., Robinson J.P., Roth R.A. 1993. Neutrophil function after exposure to polychlorinated biphenyls in vitro. *Environ Health Perspect.* 101: 430–434.
- Geeraerts, C., Goemans, G., Quataert, P., & Belpaire, C. (2007). Ecologische en ecotoxicologische betekenis van verontreinigende stoffen in paling. Studie uitgevoerd in opdracht van de Vlaamse Milieumaatschappij, MIRA, MIRA/2007/05, INBO/R/2007/40. Research Institute for Nature and Forest.
- Gilbertson M., Kubriak T., Ludvig J., Fox G. 1991. Great Lakes embryo mortality, edema and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating waterbirds: similarity to chick edema disease. *J. Toxicol Environ Health.* 33:455-20.
- Goldstein J.A. (1980). Structure, activity relationship for the biochemical effects and the relationship to toxicity. In: Kimbrough R.D. (ed) Halogenated biphenils, terphenyls, naphtalens and related compounds. Elsevier Press. p. 164.
- Gray JS. (2002) Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar Pollut Bull.*45:46– 52.
- Gworek, B., Hajduk, A., Koda, E., Grochowalski, A., Jeske, A. (2013). Influence of a municipal waste landfill on the spatial distribution of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDDs/Fs) in the natural environment. *Chemosphere*, 92, 753–759.
- Haenlein, G.F.W. (2004). Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51, 155–163.
- Haensly W.E., Noff J.M., Sharp J.R., Morns A.C., Bedgood M.E., Boom P.D. (1982). Histopathology of *Pleuronectes platessa* L. from Aber

- Wrackh and Aber Benois, Brittany, France: long-term effects of the Amoco Cadiz crude oil spill. *J. Fish. Dis.* 5: 365-91.
- Hauser R., Chen Z., Pothier L., Ryan L., Altshul L., 2003. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ. Health Perspect.* 111, 1505-11.
- Henríquez-Hernández LA, Boada LD, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Ruiz-Suárez N, Jaén Sánchez N, Valerón PF, Zumbado M, Camacho M, Luzardo OP (2015). Relationship of polychlorinated biphenyls (PCBs) with parasitism, iron homeostasis, and other health outcomes: Results from a cross-sectional study on recently arrived African immigrants. *Environ Res*,150:549-56.
- Hombach-Klonisch S., Pocar P., Kietz S., Klonisch T. 2005. Molecular actions of polyhalogenated arylhydrocarbons (PAHs) in female reproduction. *Curr Med Chem.* 12(5): 599-616.
- Houde M(1), Muir DC, Kidd KA, Guildford S, Drouillard K, Evans MS, Wang X, Whittle DM, Haffner D, Kling H. (2008). Influence of lake characteristics on the biomagnification of persistent organic pollutants in lake trout food webs. *Environ Toxicol Chem.*27(10):2169-78.
- Huang Q., Huang X., 1987. The effect of benzene hexachloride on mouse sperm. *Zhejiang Yike Daxue Xuebao.* 16, 9-12.
- Hutson D.H. e Hoadley E.C.,1974. The oxidation of a cyclic alcohol (12-hydroxyendrin) to a ketone (12-keto-endrin) by microsomal monooxygenation. *Chemosphere.* 3: 205-10.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1987a. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum. Vol. 18 (suppl.7).
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1987 b). IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Vol. 20 (suppl.7).
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1991). IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Vol. 53.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2001). IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. Vol. 79.
- Ingelido, A.M., Abballe, A., Di Domenico, A., Fochi, I., Iacovella, N., Saragosa, et al. (2009). Levels and profiles of Polychlorinated Dibenzo-

- p-Dioxins, Polychlorinated Dibenzofurans, and Polychlorinated Biphenyls in feedstuffs and milk from farms in the vicinity of incineration plants in Tuscany, Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, 397–404.
- Iverson F., 1976. Induction of paraoxon dealkylation by hexachlorobenzene (HCB) and mirex. *J. Agric. Food Chem.* 24, 1238-46.
- Janicki R.H., Kinter W.B. (1971). DDT: Disrupted osmoregulatory events in the intestine of the eel *Anguilla rostrata* adapted to seawater. *Science*. 173 (4002): 1146-8.
- Jimenez B.D. e Stegeman J.J. (1990). Detoxication enzymes as indicators of environmental stress. In: Adams S.M. (ed.)
- Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Society Symposium*. 8: 67-79.
- Johnson L.L., Stehr C.M., Olson O.P., Myers M.S., Pierce S.M., Wigren C.A., McCain B.B., Varanasi U. (1993). Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the north-east coast of the United States. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2759-71.
- Jørgensen EH1, Vijayan MM, Killie JE, Aluru N, Aas-Hansen Ø, Maule A. (2006). Toxicokinetics and effects of PCBs in Arctic fish: a review of studies on Arctic charr. *J Toxicol Environ Health A*. 69(1-2):37-52.
- Keane W.T. e Zavon M.R. (1969). The total body burden of dieldrin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 4(1): 1-16.
- Kelce W.D., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M., 1995. The persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375, 581-5.
- Khan R.A. (1999). Length-mass relationship, histopathology and parasitism in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living near a PCB-contaminated naval facility in Newfoundland. *Can. J. Zool.* 77: 381-8
- Khan R.A. (2003). Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44(4): 485-92.

- Kinter W.B., Merkens L.S., Janicki R.H., Guarino A.M. (1972). Studies on the mechanism of toxicity of DDT and polychlorinated biphenyls (PCBs): disruption of osmoregulation in marine fish. *Environ. Health Persp.* 1: 169-73.
- Koner B.C., Banerjee B.D, Ray A., 1998. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 36, 395-8.
- Korach K.S., Sarver P., Chae K., McLachlan J.A., McKinney J.D. 1988. Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. *Mol Pharmacol.* 33: 120-26.
- Krystyniak K., Bernier J., Hugo P., Fournier M., 1986. Suppression of MHV3 virus-activated macrophages by dieldrin. *Biochem. Pharmacol.* 35, 2577-86.
- Krokos, F., Creaser, C.S., Wright, C., Startin, J.R. (1996). Levels of selected ortho and non-ortho polychlorinated biphenyls in UK retail milk. *Chemosphere*, 32(4), 667–673.
- Kunisue T., Nakanishi S., Watanabe M., Abe T., Nakatsu S., Kawauchi S., Sano A., Horii A., Kano Y., Tanabe S. 2005. Contamination status and accumulation features of persistent organochlorines in pet dogs and cats from Japan. *Environ. Pollut.* 136, 465-76.
- Kupfer D., Bulger W.H., 1976. Studies on the mechanism of estrogenic actions of o,p-DDT: interactions with the estrogen receptor. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6, 461-70.
- Laden F., Hankinson S.E., Wolff M.S., Colditz G.A., Willett W.C., Speizer F.E., Hunter D.J., 2001. Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer: an extended follow-up in the Nurses' Health Study. *Int. J. Cancer.* 91, 568-74.
- Larsson P., Hamrin S., Okla L. (1990). Fat content as a factor inducing migratory behavior in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. *Naturwissenschaften.* 77: 488-90.
- Licata P1, Trombetta D, Cristani M, Giofrè F, Martino D, Calò M, Naccari F. (2004). Levels of "toxic" and "essential" metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environ Int.* 30(1):1-6.

- Lichtenstein E.P. e Schultz K.R. (1960). Epoxidation of aldrin and heptachlor in soils as influenced by autoclaving, moisture, and soil types. J. Econ. Entomol. 53: 192-7.
- Loflen C.L., 2013 Examination of spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*) pollutant bioaccumulation in San Diego Bay, San Diego, California. Peer J. 1, e213.





## **Parte seconda - Sperimentale**



## 2.1 Piano di lavoro

### 2.1.1 *Analisi dei livelli di OC nel latte di capra*

Nonostante l'emanazione di leggi sempre più restrittive riguardo la produzione, l'uso e lo smaltimento di molti inquinanti organoalogenati, la contaminazione ambientale da essi indotta rimane di difficile risoluzione sia per la più volte indicata elevata persistenza degli xenobiotici sia per il frequente mancato rispetto delle prescrizioni imposte dalle normative emanate a tutela dell'ambiente e della salute pubblica. Per tale motivo negli ultimi anni, pur osservando un trend di riduzione generale dei livelli residuali di OC, l'attività di ricerca, tesa a monitorarne la diffusione e persistenza negli ecosistemi ambientali, promossa a livello internazionale, non ha subito inflessioni ma incrementi.

Come già sottolineato nella parte introduttiva, l'esposizione degli organismi viventi agli OC, avviene principalmente per via alimentare e in particolare nell'uomo, attraverso il consumo di prodotti di origine animale. Infatti, se l'esposizione accidentale od occupazionale riveste carattere di eccezionalità e riguarda solo una fetta limitata di popolazione, in media, l'esposizione umana giornaliera deriva per il 90% dall'assunzione di alimenti contaminati (per il 90% di origine animale) ed in particolare modo dal consumo di prodotti ittici e lattiero-caseari oltre ai prodotti della pesca (Malish *et al.*, 2014).

Latte e latticini sono parte di una dieta mediterranea sana che, oltre al latte vaccino, contempla come materia prima latte di pecora, bufala, capra e

asina da soli o in miscela. La capra è uno degli animali domestici più “antichi”; il suo impiego per la produzione di latte e derivati e di carne è ben noto e risale almeno a partire dal 2500 a.C., in Medio Oriente (Salah, 2005). Dopo aver registrato una netta contrazione dei consumi all'inizio del XX secolo, il latte di capra sta negli ultimi anni, riguadagnando il prestigio perduto in quanto la produzione e commercializzazione è risultata vistosamente aumentare, sia per l'impiego diretto alimentare sia per la produzione di prodotti derivati. Le sue proprietà dietetico - nutrizionali sono infatti degne di nota, tanto da renderlo un valido sostituto al tradizionale latte vaccino. Tra l'altro, l'Italia è annoverata tra i quattro principali Paesi del Mediterraneo per la produzione di latte di capra (Escareño et al., 2013).

Questo latte ha un elevato contenuto di calcio ed è quindi particolarmente indicato per bambini ed anziani, è caratterizzato da acidi grassi a catena corta che lo rendono più digeribile rispetto al latte vaccino e ha un buon contenuto di sali minerali, quali potassio, rame, manganese e ferro, nonché vitamine A-B-C-E. È più grasso del latte vaccino per la diversa alimentazione dell'animale, (4,8 gr contro i 3,6 gr di quello vaccino, per 100 ml di prodotto) (Tabella 3) e, analogamente al latte materno ha un'elevata percentuale di taurina, aminoacido che svolge un ruolo importante sull'accrescimento e sullo sviluppo cerebrale dei bambini. Il latte di capra è quello che ha il minor contenuto di colesterolo se confrontato con il latte di pecora e vacca ma anche di acido folico e B12, per cui un consumo esclusivo e protratto richiede un'integrazione. Il latte di capra, dopo quello di asina, è quello più simile al latte materno, per questo ideale per i bambini. La sua composizione unica lo rende

particolarmente utile nell'alimentazione dei neonati, dei bambini che hanno intolleranze o allergie a componenti del latte vaccino e degli adulti in convalescenza da patologie gastroduodenali.

*Tab. 2–3. Composizione media del latte di varie specie e valore energetico (Polidori - 1994)*

| Tipo di latte | Residuo secco<br>% | Grasso<br>% | Proteine<br>% | Lattosio<br>% | Ceneri<br>% | Valore energetico<br>KJ/Kg |
|---------------|--------------------|-------------|---------------|---------------|-------------|----------------------------|
| Donna         | 12.43              | 3.38        | 1.64          | 6.69          | 0.22        | 2855.6                     |
| Asina         | 9.61               | 1.21        | 1.74          | 6.23          | 0.43        | 1939.4                     |
| Cavalla       | 9.52               | 0.85        | 2.06          | 6.26          | 0.35        | 1877.8                     |
| Bovina        | 12.38              | 3.46        | 3.43          | 4.71          | 0.78        | 2983.0                     |
| Capra         | 13.23              | 4.62        | 3.41          | 4.47          | 0.73        | 3399.5                     |
| Pecora        | 19.52              | 7.54        | 6.17          | 4.89          | 0.92        | 5289.4                     |

I lavori di monitoraggio presenti in letteratura sono in larga misura condotti sul latte di mucca e di pecora raccolti da aziende agricole o nei supermercati mentre sono quasi del tutto assenti studi tesi ad analizzare la presenza degli OC nel latte di capra. Quest'ultimo, contenendo più del 4% di grasso può facilmente accumulare contaminanti lipofili. Gli erbivori in genere possono introdurre ed immagazzinare, nei tessuti ricchi di grassi, residui di POPs in seguito al consumo di mangime o pascolo contaminato (Kumari, 1995). Una delle principali vie di escrezione degli OC in queste specie è rappresentata proprio dal latte in cui i tossici sono eliminati in forma legata alla componente grassa. Tale matrice può quindi rappresentare un importante indicatore biologico dei livelli di esposizione per gli animali che vivono per un prolungato periodo di tempo in un ambiente inquinato (Vrecl, 2003). La contaminazione del latte da OC oltre alla specie e all'area geografica considerata, dipende da fattori ambientali

connessi al sistema di allevamento e alla dieta degli animali, età, stadio di lattazione, e stagionalità (Krokos et al., 1996). Variazioni importanti dei livelli di contaminazione dipendono infatti anche dalle specifiche condizioni dell'ambiente in cui vivono gli animali sottoposti a monitoraggio. In particolare, quando gli animali sono al pascolo, l'ingestione involontaria del suolo, la cui contaminazione da OC è generalmente uguale o superiore a quella dell'erba, può rappresentare motivo di grande preoccupazione (Gworek et al., 2013). Alcuni autori hanno rilevato elevate concentrazioni di OC nel latte prodotto nei pressi di inceneritori, fonderie o autostrade (Ramos et al., 1997; Turrio-Baldassarri et al. 2009; Desiato et al. 2014; Bertocchi et al. 2015).

Nella prima parte sperimentale della tesi lo studio di monitoraggio condotto ha avuto lo scopo principale di valutare se la presenza di rifiuti di origine urbana ed industriale, illegalmente smaltiti, potesse essere direttamente correlabile alla contaminazione degli alimenti da PCB.

Lo studio si è basato su tre condizioni principali: 1) l'impiego di campioni di latte provenienti da aziende gestite da pastori e piccoli agricoltori che adottano il sistema di produzione estensivo, la cui caratteristica principale è che le capre pascolano libere nell'area intorno all'azienda (e quindi possono anche alimentarsi con rifiuti, oltre a erba e terreno); 2) il confronto delle concentrazioni di PCB misurate nel latte di capre della provincia di Caserta, zona della terra dei fuochi ad alto rischio ambientale, con quelle rilevate nel latte della zona di controllo individuata nelle province di Benevento e Salerno, dove i livelli di contaminazione sono presumibilmente molto più bassi; 3) la valutazione dei livelli residuali di

POC il cui riscontro, diversamente dai PCB, non è correlabile alla presenza di rifiuti, e quindi non dovrebbe evidenziare differenze tra le aree esaminate.

### *2.1.2 Analisi dei livelli di OC nel muscolo di trota Mediterranea (Salmo trutta) del parco della Sila (Calabria)*

Come precedentemente riportato, i prodotti della pesca sono tra le principali fonti alimentari di esposizione umana agli OC.

Grande rilevanza hanno quindi assunto negli ultimi tempi gli studi di monitoraggio del livello di contaminazione degli ecosistemi acquatici che hanno consentito di evidenziare uno stato di contaminazione diffusa a livello globale e particolarmente critica nell'area del Mediterraneo.

Lo scopo della seconda parte sperimentale della presente tesi è stato, partendo dalle premesse riportate, quello di valutare lo stato di contaminazione ambientale di un'area geografica italiana poco monitorata, quella della regione Calabria. Per questo territorio ci sono pochi lavori in letteratura che valutano lo stato di inquinamento in generale e quindi anche da OC. Solo un lavoro analizza i livelli di contaminazione da POC e PCB in alcuni organi e tessuti di cinghiali calabresi ed evidenzia la presenza, in questa specie terrestre selvatica di scarsi livelli residuali (Naccari et al., 2004).

E' stato preso in esame l'ecosistema acquatico della Calabria attraverso lo studio di una specie dulciacquicola quale la trota Mediterranea che è molto diffusa e di frequente consumo alimentare domestico.

Le trote vivono in acque dolci, preferibilmente fredde quali torrenti di montagna e laghi. La trota Mediterranea è un pesce di taglia media, le cui dimensioni massime raramente superano i 45-50 cm di lunghezza e 1,2-1,5 kg di peso, ha il corpo allungato e coperto di piccole squame (figura 4). Si nutre, soprattutto nelle ore crepuscolari e notturne, di insetti (tricotteri, plecoteri e ditteri) e crostacei, più raramente di pesci, anfibi e piccoli mammiferi. Gli esemplari adulti sono solitari e territoriali e stazionano, anche in acque profonde, nei pressi di rocce e radici in attesa di una possibile preda; i giovani si riuniscono invece in prossimità delle rive, in acque basse e a velocità di corrente moderata. Durante il periodo della riproduzione, che si estende tra dicembre e aprile, le aree di deposizione vengono scelte in acque basse e correnti, con fondo ghiaioso e sgombro da vegetazione sommersa. I maschi sono sessualmente maturi quando misurano 17-19 cm di lunghezza (peso medio 80g circa), le femmine a 28-30 cm (peso medio 300 g circa).

Nel muscolo delle trote campionate sono stati ricercati diversi PCB-NDL e PCB-DL oltre ad alcuni POC. I risultati ottenuti, oltre a consentire di fare valutazioni eco-tossicologiche consentiranno di effettuare una stima del rischio tossicologico per il consumatore finale ma anche per le specie oggetto di studio.





*Fig. 2-1. Esemplare di trota Mediterranea (Salmo trutta)*

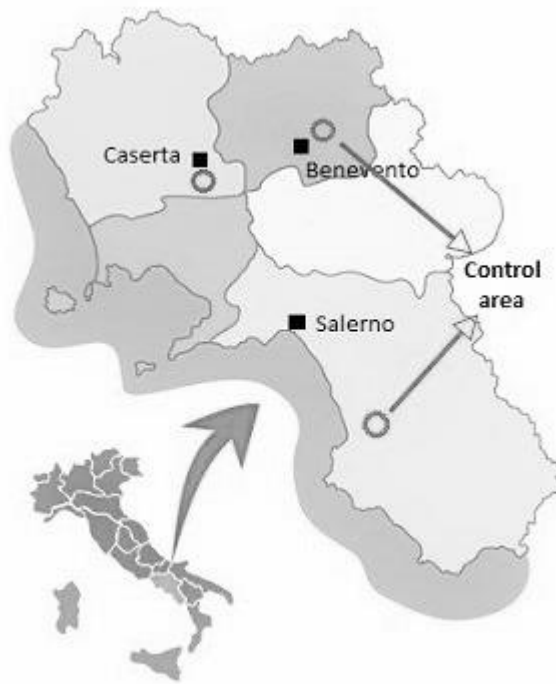
Inoltre, è stata condotta una analisi di correlazione tra presenza o meno di infestazione da parassiti intestinali e concentrazione di OC. Alla base di questa valutazione vi è il presupposto per cui l'immunodepressione conseguente ad una esposizione cronica ai PCB potrebbe causare una maggiore predisposizione all'infestazione parassitaria. A tale proposito, sono pochi in letteratura i lavori condotti con lo scopo di ricercare una eventuale correlazione tra contaminanti ambientali persistenti e parassiti e con risultati spesso contraddittori. Sagerup et al (2009) provarono a verificare se l'infezione parassitaria evidenziata in gabbiani adulti delle isole di Svalbard fosse correlabile alla contaminazione da metalli pesanti e/o POPs. Tuttavia, gli autori evidenziarono una correlazione positiva solo con i livelli di selenio e mercurio indicandola come fortuita interessando questa solo un numero limitato di animali sottoposti ad osservazione. Henríquez-Hernández e suoi collaboratori (2015), evidenziarono addirittura una correlazione inversa tra i livelli serici di PCB e parassiti intestinali in uomini africani emigranti in Spagna. Analogamente, anche

Carreras-Aubets et al (2012) rilevarono una riduzione dei livelli di diversi ecto e endoparassiti nel *Mullus barbatus* con l'aumentare dei livelli di PCB. L'analisi proposta ha avuto lo scopo proprio di provare a fornire un contributo al chiarimento dell'esistenza o meno di una potenziale relazione tra le due variabili.

## 2.2 Descrizione dei materiali e delle metodologie applicate

### 2.2.1 Campionamento del latte di capra

Il campionamento è stato effettuato a inizio estate (giugno 2013). Sono state raccolte 56 unità campionarie di latte di capra da 4 aziende zootecniche situate in tre diverse province della Campania quali Salerno (2 aziende), Benevento e Caserta (Fig. 5).



*Fig. 2-2. La figura mostra le aree della regione Campania dove è stato eseguito il campionamento.*

Nell'area di controllo, sono state raccolte 20 unità campionarie di latte per provincia provenienti da 40 diverse capre. Da Caserta, invece, 16 unità campionarie di latte provenienti ugualmente da 16 capre diverse.

Le aziende agricole selezionate, molto vicine a insediamenti urbani, erano gestite da pastori e piccoli agricoltori che avevano adottato il sistema di produzione estensivo. Tutte le capre erano di razza meticcias e tenute in stalle libere. Di solito erano libere di pascolare intorno all'azienda e la loro dieta era integrata con fieno di erba medica di produzione locale. Tutte le capre erano sane; non è stata riportata nessuna malattia durante la gravidanza. Il campione è stato selezionato per l'età degli animali sia nell'area di Caserta che in quella di controllo (in media 4 anni). I campioni di latte provenivano dalla mungitura della sera praticata a mano con procedure standardizzate. In particolare, la raccolta è stata eseguita nella stessa giornata in cui l'unità campionaria è stata poi consegnata al laboratorio, durante la stessa fase di lattazione. Ogni unità era un'aliquota di tutto il latte raccolto dal singolo animale nella stessa mungitura.

Il latte prelevato è stato posto in contenitori di polietilene; immediatamente refrigerato su ghiaccio per consentire l'invio dei campioni in idonee condizioni di trasporto. Giunti al laboratorio della sezione di Tossicologia, sono stati suddivisi in aliquote di 10 ml ciascuna e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi chimica. Per ciascun campione si è proceduto alla registrazione dei dati riguardanti l'animale produttore (provenienza, età, fase della lattazione, numero di parti, alimentazione, ecc). Le fasi di campionamento e di stoccaggio sono state eseguite in modo da ridurre al

minimo la possibilità di una contaminazione e di qualsiasi alterazione che potesse pregiudicare il risultato delle analisi.

### 2.2.2 Campionamento del muscolo di trota Mediterranea

Il campionamento delle trote è stato eseguito nel Parco Nazionale della Sila (precisamente nella fiumara del Trionto-Alta Valle del Neto ubicata nella provincia di Cosenza) dove la specie dulciacquicola è molto diffusa (fig.6)



Fig. 2-3. La figura evidenzia l'area di campionamento

La cattura dei pesci, 40 esemplari appartenenti alla specie *Salmo Trutta* (trota Mediterranea), è stata eseguita durante il periodo tra luglio-dicembre 2014. Il campionamento è stato effettuato utilizzando il metodo dello

stordimento elettrico in modo da poter effettuare un recupero selettivo senza danneggiare le altre specie presenti nei corsi d'acqua sedi dei prelievi.

Giunti al laboratorio di Tossicologia sono stati registrati i dati biometrici (peso e lunghezza) e prelevate le porzioni edibili.

### 2.2.3 *Reagenti*

Tutti i solventi impiegati, esano, acetonitrile, etanolo, metanolo, isottano, toluene, etilacetato per pesticidi, della ROMIL e la C18 isolate, 40-60 mesh, precedentemente attivata, sono stati acquistati dalla Delchimica Scientific Glassware. Il Sodio solfato anidro è stato acquistato dalla Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri). Le cartucce extrelut-3, Cartucce extrelut-1 ed il Florisil PR, 60-100 mesh sono stati acquistati dalla VWR International. Gli standard di PCB sono stati acquistati dalla LabService (Bologna). Le colonne cromatografiche CP-SIL 5CB e Rtx-1701 sono state acquistate dalla Restek (UK).

### 2.2.4 *Metodica analitica per l'analisi degli OC nel latte di capra*

Per la procedura analitica concernente la ricerca di pesticidi organoclorurati e bifenilipoliclorurati nel latte di capra ci si è basati sulla metodica descritta da Di Muccio e collaboratori (2002), alla quale sono state apportate opportune modifiche. Le varie fasi prevedono una iniziale estrazione della porzione lipidica dalle matrici organiche in esame, una successiva purificazione della stessa, e il frazionamento dell'estratto per permetterne una migliore lettura tramite gas-cromatografo munito di rilevatore a cattura di elettroni (GC/ECD).

### **I fase) Estrazione liquido/liquido**

Dopo scongelamento del campione, posto in frigorifero la sera prima dell'analisi, l'aliquota (10 ml) è stata posta in un provettone da centrifuga, in vetro da 60 ml con tappo a vite, a cui sono stati addizionati, dopo sonicazione in bagnetto ad ultrasuoni termostatato per 15 minuti, 20ml di esano, 5ml di acetonitrile ed 1ml di etanolo. L'estrazione dei grassi è stata ottenuta mediante agitazione manuale del campione per 2 min. e successiva centrifugazione per 4 min. a 2000 r.p.m per ottenere la separazione delle fasi. Il surnatante ottenuto è stato prelevato e posto in una colonna in vetro (200x20 mm di diametro interno con un restringimento di 55x5mm i.d) contenente 20 gr di sodio solfato anidro e raccolto in un pallone da vuoto precedentemente pesato.

L'estrazione è stata ripetuta altre 2 volte con 20ml di esano per ottimizzare il processo di estrazione. L'eluato ottenuto è stato portato a secco in rotavapor, (t° del bagnetto 35°/40°C) fino ad un volume di 1-2 ml e poi manualmente, per permettere il calcolo gravimetrico del grasso estratto eseguito per differenza.

### **II fase) Ripartizione acetonitrile/esano**

Il grasso estratto è stato ripreso con esano e trasferito in una cartuccia Extrelut-3 (contenente polvere di diatomea a diversa granulometria). Successivamente, l'esano è stato rimosso dalla cartuccia mediante flusso d'azoto. Al di sotto della cartuccia Extrelut-3 è stata posizionata una

seconda cartuccia di tipo Extrelut-1 modificata con l'aggiunta di C18. Il sistema combinato di cartucce è stato eluito con acetonitrile e l'eluato raccolto in un pallone da vuoto. Successivamente, previa aggiunta di 4 ml di metanolo, l'eluato è stato portato a secco fino alla quantità di circa 1 ml in rotavapor (con bagnetto a 40°C) e poi manualmente.

### **III fase) Cromatografia di adsorbimento su colonna con florisil attivato**

Una colonna cromatografica in vetro (30 cm x 10 mm i.d. con un rubinetto in PTFE ed estremità inferiore maschio) è stata impaccata con 2,5 g di florisil attivato in stufa a 130° per 14 h, al di sopra del quale è stato posto uno strato di 1 cm di sodio solfato anidro, e condizionata con 15 ml di esano. L'estratto precedentemente ottenuto è stato sciolto in 1 ml di esano e trasferito nella colonna cromatografica. Si è proceduto, quindi, alla raccolta delle due frazioni del campione. L'eluizione è avvenuta secondo il seguente schema:

1<sup>a</sup> F: 30 ml di esano

2<sup>a</sup> F: 25 ml di esano-toluene, 80:20 v/v

Ciascuna frazione è stata raccolta in un pallone da vuoto ed è stata portata completamente a secco in rotavapor (T° del bagnetto 40°C per la 1<sup>a</sup> F e 50°C per 2<sup>a</sup> F) con flusso leggero di azoto. Alla prima frazione è stato



aggiunto isotano come “keeper”. Ogni frazione è stata ripresa con un volume fisso di cicloesano contenente lo standard interno (PCB 209) alla concentrazione di 30 ppb. Successivamente, 1 µl di ciascuna frazione è stato iniettato nel gascromatografo Carlo Erba 5160 Serie Mega munito di detector a cattura di elettroni  $^{63}\text{Ni}$  (ECD). L’iniezione del campione è stata eseguita mediante tecnica cold on-column.

Le condizioni operative dell’apparecchio sono state le seguenti:

- gas carrier: elio (pressione in testa alla colonna di 55 kPa);
- gas di make up: azoto (flusso 40 ml/min.);
- temperatura del detector: 310°C.;
- temperatura programmata: isoterma iniziale a 60°C per 10 min;  
fino a 170°C, incremento di 15°C/min;  
fino a 215°C incremento di 10°C/min;  
fino a 260°, incremento di 20°C/min;  
isoterma di 5 min.

Per ciascuna unità campionaria sono stati misurati i livelli di concentrazione di cinque OCP (HCB, *p,p'*-DDT e i suoi metaboliti quali *p,p'*-DDE, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDD e *o,p'*-DDT) e diciotto isomeri di PCB non dioxin-like, (n. 28, 52, 74, 66, 101, 99, 146, 153, 138, 128, 187, 183, 177, 180 170, 201, 194, 196). Tra i suddetti PCB presi in esame, i congeneri non diossino-simili PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 sono stati identificati dalla comunità scientifica internazionale come i sei congeneri “indicatori” (regolamento UE 1259/2011) in quanto la somma di questi

PCB risulta essere predominante rispetto agli altri congeneri nelle varie matrici ambientali e alimentari studiate quindi consentendo di effettuare una stima molto attendibile dei livelli complessivi dei PCB non diossino simili.

Per l'identificazione degli analiti ci si è basati sui relativi tempi di ritenzione, ottenuti tramite l'analisi di soluzioni standard dei singoli composti e verificati giornalmente mediante l'esame di una soluzione standard costituita da un mix delle varie sostanze a concentrazioni note. Le singole soluzioni standard di base, ottenute dall'Ehrenstorfer Company (Asburgo, Germania), avevano una concentrazione di 10 ng/μl in cicloesano (o isotano in alcuni casi); a partire da tali soluzioni sono state poi preparate miscele a 5 differenti concentrazioni (1, 5, 10, 50 e 100 ppb) impiegate per costruire idonee curve di calibrazione. La quantificazione delle concentrazioni degli analiti è infatti avvenuta tramite paragone delle aree dei singoli picchi relativi ai composti presenti nel campione con quelle dei picchi presenti nei cromatogrammi di riferimento dei mix standard. Per ottimizzare tale comparazione, e per annullare l'influenza di errori umani nel prelievo delle aliquote da iniettare, è stato utilizzato il metodo dello standard interno. Quest'ultimo consiste nell'aggiungere nella fase finale ai campioni da analizzare una quantità fissa e nota di un composto che abbia comportamento simile a quello degli analiti, ma che sia facilmente distinguibile da essi nel tracciato cromatografico e che non sia normalmente presente nelle matrici considerate. In questo caso la scelta è ricaduta sul PCB 209, aggiunto ai campioni nella quantità di 30 ng, e presente in concentrazione costante anche nei diversi mix standard. Le operazioni di integrazione delle aree dei picchi cromatografici, come anche

quelle relative al successivo calcolo delle concentrazioni, sono state effettuate impiegando uno specifico software (Chrom-card, ThermoFinnigan).

Per verificare l'efficienza della metodica estrattiva, campioni presumibilmente non contaminati (bianchi) quali latti per la prima infanzia, sono stati impiegati per effettuare prove di recupero aggiungendo rispettivamente 5, 10 o 50 ng di ciascun analita (escluso il PCB 209) a 3 diverse aliquote. I campioni sono stati poi estratti in triplicato secondo la metodica sopra descritta. Il recupero medio percentuale per i singoli POC e PCB ricercati oscillava tra il 87 ed il 105%. Inoltre, sono state effettuate analisi con specifiche matrici certificate (latte in polvere BCR-188 e BCR-450 per l'analisi, rispettivamente, dei POC e dei PCB, fornita dall'Institute for Reference Materials and Measurements). Le deviazioni standard rispetto ai valori certificati erano inferiori al 10%. Il limite di rilevazione (LOD) per i pesticidi organoclorurati e i bifenilipoliclorurati era compreso tra 0.08-0.60 ng/g. Quando le quantità rilevate erano inferiori a tali limiti sono state indicate come non determinabili (n.d.).

I risultati sono stati poi espressi come concentrazioni su base lipidica (ng/g LW), ottenuta dividendo i valori rilevati per il quantitativo di grasso estratto dal relativo campione di origine, e sul tal quale o wetweight (ng/g WW), rapportando i precedenti dati alla percentuale lipidica del campione. L'espressione della concentrazione sul tal quale consente la comparazione dei dati con i limiti massimi residuali (LMR) stabiliti a livello europeo per i composti di interesse nella matrice studiata; la scelta di esprimere le concentrazioni anche su base lipidica è derivata dalla necessità di

normalizzare le stesse al fine di poter meglio paragonare i livelli di inquinanti lipofili presenti in matrici con differenti quantitativi di grasso corporeo.

Abbiamo usato la sigla  $\Sigma 6\text{PCB}$  e  $\Sigma 7\text{PCB}$  per indicare, rispettivamente, la somma delle concentrazioni dei picchi risolti relative ai soli 6 congeneri di “PCB indicatori” e questi in associazione con il PCB 118; con  $\Sigma 20\text{PCB}$  la somma di tutti i congeneri analizzati cioè i sei PCB marcatori e gli altri ricercati. La sigla  $\Sigma \text{DDT}$  si riferisce alla somma delle concentrazioni di  $p,p'$ -DDT,  $p,p'$ -DDE e  $p,p'$ -DDD.

#### *2.2.5 Metodica analitica per l'analisi degli OC nel muscolo di trota Mediterranea*

La metodica ricalca nelle linee generali quanto riportato nel metodo descritto per l'analisi del latte di capra con alcune differenze apportate e necessarie per la diversa composizione della matrice esaminata come precedentemente descritto nel lavoro di Naso et al (2005).

##### **I fase) Estrazione liquido/liquido**

L'estrazione è stata eseguita su 3g di porzione edibile di trota. I grassi sono stati estratti a freddo, manualmente con una soluzione di etere di petrolio/acetone (1:1, v:v) e successiva centrifugazione.

##### **II fase) Ripartizione acetonitrile/esano**

Sovrapponibile a quanto già descritto per il latte di capra.

### **III fase)** Cromatografia di adsorbimento su colonna con florisil attivato

L'eluizione è avvenuta secondo il seguente schema:

- 1<sup>a</sup> F: 30 ml di esano
- 2<sup>a</sup> F: 25 ml di esano-toluene, 80:20 v/v
- 3<sup>a</sup> F: 30 ml di esano-toluene-etilacetato, 180:19:1, v/v/v

Nel muscolo di trota sono stati misurati i livelli di concentrazione di cinque OCP (HCB, Dieldrin, *p,p'*-DDT e i suoi principali metaboliti quali *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD) e quindici isomeri di PCB non dioxin-like compresi i sei congeneri indicatori (n. 28, 52, 74, 66, 101, 146, 153, 138, 128, 187, 183, 180, 170, 194, 196) oltre ai non-ortho PCB-DL n. 77, 126 e 169 e ai mono-ortho PCB-DL n. 105, 118, 156, 157 e 167.

#### *2.2.6 Analisi statistica*

L'analisi statistica è stata condotta rispetto alle concentrazioni degli OC espresse sia su ww che su lw. I dati sono stati preliminarmente analizzati attraverso le statistiche descrittive quali media e deviazione standard. La significatività statistica è stata misurata in termini del valore di probabilità (*p*-value): è stata rigettata l'ipotesi nulla quando il *p*-value era inferiore a 0.05. L'analisi di regressione è stata invece impiegata per analizzare la relazione tra la concentrazione dei PCB/POC e la presenza o meno di parassiti intestinali evidenziati nelle trote oggetto dello studio.

## 2.3 Risultati e discussione

### 2.3.1 *Analisi dei livelli di PCB e POC nel latte di capra*

Le unità campionarie provenienti dalle province di Benevento e Salerno presentavano valori di concentrazioni degli OC inferiori al LOD o molto bassi con la sola eccezione del PCB 28 e dell'HCB. Al contrario, sono state rilevate concentrazioni molto alte di vari PCB e dell'HCB nei campioni della provincia di Caserta e quasi tutti i PCB sono stati trovati in ciascuna unità campionaria. In particolare, le concentrazioni relative alla  $\Sigma 20\text{PCB}$  presentavano valori in un range da 40.59 a 1209,95 ng/g LW con una media di 387.77 ng/g LW (Tabella 4). La media della  $\Sigma 7\text{PCB}$  era pari a 209,10 ng g<sup>-1</sup> LW, corrispondente a circa il 54% del valore di  $\Sigma 20\text{PCB}$ . Tale concentrazione era in gran parte determinata, in ordine decrescente, dagli indicatori hexa- /penta-, epta e tetra-clorurati (IUPAC nos. 153, 118, 138, 180, 52), che costituivano il 51,7% della  $\Sigma 20\text{PCB}$ . Il congenere dominante era il PCB 153 (115.28 ng g<sup>-1</sup> LW, concentrazione che corrispondeva in media al 28,9% della  $\Sigma 20\text{PCB}$ ), seguito dal non-indicatore diossina-simile PCB105 insieme al non-indicatore PCB146 (42.62 ng g<sup>-1</sup> LW , cioè il 10% della  $\Sigma 20\text{PCB}$ ), e il PCB 74 (27.88 ng g<sup>-1</sup> LW, corrispondente al 5.2% della  $\Sigma 20\text{PCB}$ ) (Figura 7).

## Parte seconda - Sperimentale

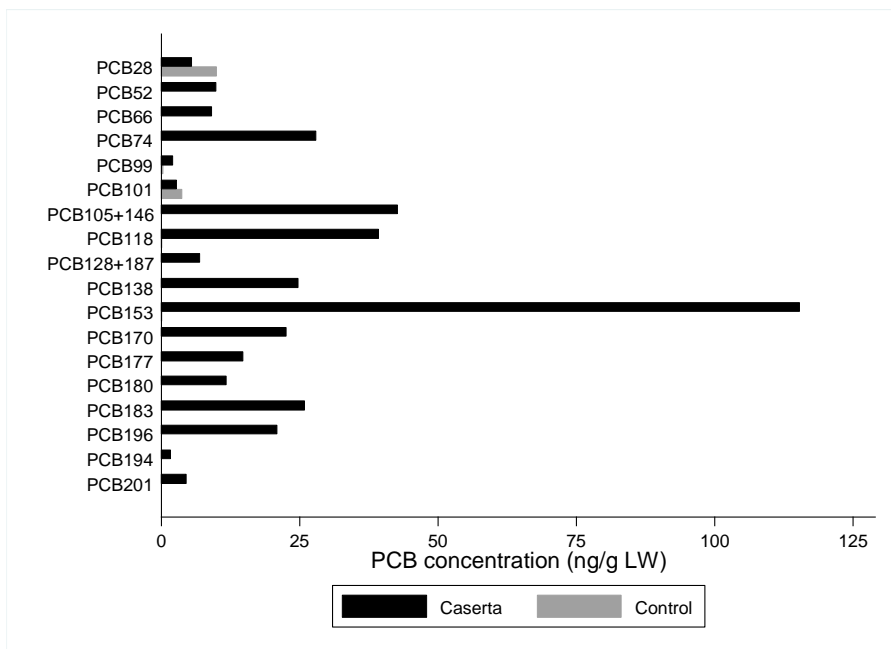
Tab. 2–4. Statistiche descrittive sulle concentrazioni di OC espresso su peso lipidico (LW) e peso fresco (WW) e contenuto lipidico (%).

|                                      | Media  | SD     | Mediana | Min   | Max     |
|--------------------------------------|--------|--------|---------|-------|---------|
| -----Panel A: Caserta-----           |        |        |         |       |         |
| $\Sigma$ 6PCB LW                     | 169.77 | 161.27 | 122.31  | 3.11  | 670.78  |
| $\Sigma$ 7PCB LW                     | 209.10 | 200.13 | 150.77  | 3.11  | 838.03  |
| $\Sigma$ 20PCB LW                    | 387.77 | 330.11 | 270.25  | 40.59 | 1209.95 |
| HCB LW                               | 8.18   | 8.68   | 6.35    | nd    | 36.51   |
| $\Sigma$ DDT LW                      | 2.39   | 7.49   | nd      | nd    | 30.12   |
| $\Sigma$ 6PCB WW                     | 2.00   | 0.98   | 2.15    | 0.05  | 4.02    |
| $\Sigma$ 7PCB WW                     | 2.46   | 1.21   | 2.70    | 0.05  | 5.02    |
| $\Sigma$ 20PCB WW                    | 4.63   | 2.28   | 4.56    | 0.68  | 7.34    |
| HCB WW                               | 0.09   | 0.05   | 0.10    | nd    | 0.22    |
| $\Sigma$ DDT WW                      | 0.05   | 0.05   | 0.03    | nd    | 0.20    |
| Contenuto lipidico                   | 1.61   | 0.78   | 1.53    | 0.60  | 3.31    |
| -----Panel B: Area di Controllo----- |        |        |         |       |         |
| $\Sigma$ 6PCB LW                     | 13.86  | 30.47  | nd      | nd    | 132.75  |
| $\Sigma$ 7PCB LW                     | 13.96  | 30.53  | nd      | nd    | 132.75  |
| $\Sigma$ 20PCB LW                    | 14.26  | 30.66  | nd      | nd    | 132.75  |
| HCB LW                               | 2.94   | 5.49   | nd      | nd    | 21.36   |
| $\Sigma$ DDT LW                      | 0.65   | 2.30   | nd      | nd    | 10.01   |
| $\Sigma$ 6PCB WW                     | 0.22   | 0.17   | 0.18    | nd    | 0.55    |
| $\Sigma$ 7PCB WW                     | 0.23   | 0.17   | 0.21    | nd    | 0.57    |
| $\Sigma$ 20PCB WW                    | 0.37   | 0.21   | 0.36    | nd    | 0.72    |
| HCB WW                               | 0.05   | 0.05   | 0.03    | nd    | 0.17    |

## Parte seconda - Sperimentale

|                    |      |      |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|------|------|
| $\Sigma$ DDT WW    | 0.05 | 0.05 | 0.05 | nd   | 0.15 |
| Contenuto lipidico | 1.93 | 0.91 | 1.80 | 0.42 | 4.15 |

*Nota:  $\Sigma$ 7PCB si riferisce alla somma dei sei indicatori insieme al PCB 118 mentre  $\Sigma$ 20PCB è la somma di tutti i PCBs.  $\Sigma$ 13PCB è definite conseguentemente.  $\Sigma$ DDT è la somma di p,p'-DDT, p,p'-DDE e p,p'-DDD.*



*Fig. 2-4. Livelli dei singoli congeneri di PCB espressi su base lipidica (LW).*

La concentrazione media della  $\Sigma$ 6PCB (169.77 ng g<sup>-1</sup> LW) è in linea con quanto riscontrato da Turrio-Baldassarri et al. (2009) nel latte bovino proveniente da allevamenti posti nelle vicinanze di stabilimenti industriali produttori di PCB fino al 1984 (Brescia). La media è invece molto superiore a quella osservata da Ingelido et al. (2009) nel latte di vacca e di pecora raccolto in allevamenti vicino a due inceneritori situati nel centro



Italia (da 1.4 a 8.2 ng g<sup>-1</sup> LW a seconda della specifica area), da Storelli et al. (2012) nel latte di pecora raccolto in una zona industrializzata della Sardegna (4,92 ng g<sup>-1</sup> LW), e da Bertocchi et al. (2015) nel latte di mucca di allevamenti nella città di Brescia (14,4 ng g<sup>-1</sup> LW). E' interessante sottolineare come invece il pattern dei congeneri rilevato è molto simile a quello descritto da tutti gli autori.

I riscontri riportati riguardanti le concentrazioni di PCB-NDL sono coerente con quanto riportato per i PCB-DL in Campania da altri autori. I dati derivanti da piani di monitoraggio relativi ad allevamenti di bovini e ovini hanno rivelato alti livelli di contaminazione nella città di Caserta, associati a una situazione di scarsa contaminazione generale in Campania (Esposito et al. 2009, 2010). Alti livelli di PCDD nel latte di capra e pecora della provincia di Caserta sono stati segnalati anche nella relazione tecnica di Di Fusco (2006). Diletti et al. (2003) riscontrarono che circa un terzo dei campioni di bufalo, capra e pecora analizzati superava il LMR fissato per gli OC dalla Comunità Europea. Inoltre, gli autori riportarono una concentrazione di PCDD/F nelle produzioni locali, come fieno ed erba maggiore di quella riscontrata in cereali e altri alimenti farinacei, premiscele e mangimi misti la qual cosa attesta che la contaminazione ha avuto una origine locale.

Le concentrazioni dei POC sono riportate nella tabella 4. Analogamente a quanto osservato per i campioni di Benevento e Salerno, il p,p'-DDT e il p,p'-DDD, similamente a quanto evidenziato per il Dieldrin e il p,p'-DDE, non sono mai stati rilevati nel campione di latte da Caserta. Infine, in maniera non casuale, l'HCB è stato il pesticida più frequentemente rilevato

nel latte di Caserta, con concentrazioni comprese tra i valori nd e 36.51 ng g<sup>-1</sup> LW, mentre la sua presenza è stata molto rara nel latte della zona di controllo. La presenza di HCB, come accennato nella premessa alla parte sperimentale, si spiega facilmente perché è un sottoprodotto dei processi di fabbricazione dei vari prodotti chimici contenenti cloro ed un'impurità che origina in parecchi processi chimici di sintesi (Wang et al. 2010).

La tabella 6 mostra i risultati del test della differenza tra medie delle concentrazioni di OC tra Caserta e l'area di controllo. Tutte le differenze, tranne quella della  $\Sigma$ DDT, statisticamente differenti da zero.

*Tab. 2-5. Test della differenza tra medie relativo alle concentrazioni di OC espresse sul peso lipidico (LW) e sul peso fresco (WW) tra Caserta e l'area di controllo.*

|                   | Controllo | Caserta | Differenza |
|-------------------|-----------|---------|------------|
| $\Sigma$ 7PCB LW  | 3.96      | 209.10  |            |
| 195.147***        |           |         |            |
| [0.05]            | [0.00]    | [0.000] |            |
| $\Sigma$ 13PCB LW | 0.30      | 178.67  |            |
| 178.370***        |           |         |            |
| [0.33]            | [0.00]    | [0.000] |            |
| $\Sigma$ 20PCB LW | 14.26     | 387.77  |            |
| 373.517***        |           |         |            |
| [0.05]            | [0.00]    | [0.000] |            |
| HCB LW            | 2.94      | 8.18    | 5.231*     |
| [0.03]            | [0.00]    | [0.034] |            |

## Parte seconda - Sperimentale

|                   |        |         |      |        |
|-------------------|--------|---------|------|--------|
| $\Sigma$ DDT LW   |        | 0.65    | 2.39 | 1.741  |
| [0.22]            | [0.22] | [0.331] |      |        |
| $\Sigma$ 7PCB WW  |        | 0.23    | 2.46 |        |
| 2.234***          |        |         |      |        |
| [0.00]            | [0.00] | [0.000] |      |        |
| $\Sigma$ 13PCB WW |        | 0.14    | 2.16 |        |
| 2.022***          |        |         |      |        |
| [0.00]            | [0.00] | [0.000] |      |        |
| $\Sigma$ 20PCB WW |        | 0.37    | 4.63 |        |
| 4.256***          |        |         |      |        |
| [0.00]            | [0.00] | [0.000] |      |        |
| HCB WW            |        | 0.05    | 0.09 | 0.045* |
| [0.00]            | [0.00] | [0.011] |      |        |
| $\Sigma$ DDT WW   |        | 0.05    | 0.05 | -0.001 |
| [0.00]            | [0.00] | [0.934] |      |        |

Nota:  $\Sigma$ 7PCB si riferisce alla somma dei sei indicatori insieme al PCB 118 mentre  $\Sigma$ 20PCB è la somma di tutti i PCBs.  $\Sigma$ 13PCB è definite conseguentemente.  $\Sigma$ DDT è la somma di  $p,p'$ -DDT,  $p,p'$ -DDE e  $p,p'$ -DDD.

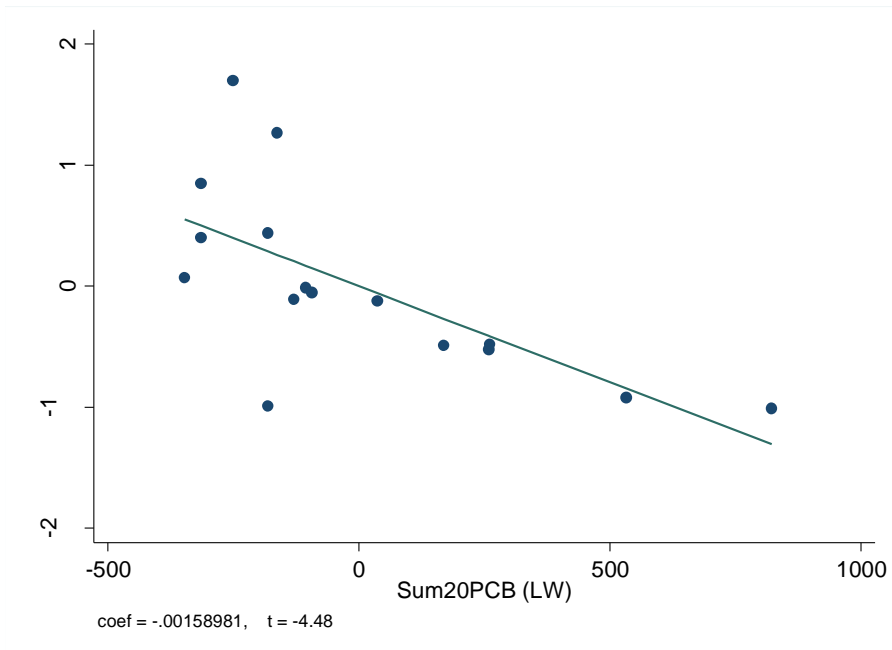
Probabilmente, i livelli di PCB molto più alti nel latte di capra proveniente da Caserta rispetto alla zona di controllo possono essere correlati al pascolo degli animali avvenuto in zone caratterizzate dalla presenza diffusa delle discariche abusive con rifiuti di origine urbana e industriale. Dalla fine degli anni 1980, lo smaltimento dei rifiuti è infatti uno dei

business più redditizi della mafia attiva nel territorio della provincia di Caserta. I risultati dello studio di biomonitoraggio SEBIOREC (De Felip et al. 2014) confermano che molti comuni appartenenti alla provincia di Caserta sono contrassegnati dalla presenza di contaminanti organici e che tale presenza è correlabile ad una maggiore incidenza di malattie soprattutto oncologiche. I risultati suggeriscono che i terreni e l'erba ingeriti durante il pascolo delle capre erano fortemente contaminati.

Il pattern di distribuzione dei PCB che caratterizza il campione di Caserta trova una spiegazione nella letteratura che analizza la cinetica degli OC e il loro trasferimento foraggio-latte. Costera et al. (2006), per esempio, hanno indagato il trasferimento di 18 PCB nel latte di capre alimentate per 10 settimane con fieno contaminato raccolto in prossimità di un inceneritore di rifiuti urbani pericolosi. I tre congeneri indicatori, PCB 138, PCB 153 e PCB 180 sono stati predominanti nei campioni di mangimi e di latte e sono stati quelli con il più alto tasso di trasferimento al latte (superiore al 40%). Gli altri tre indicatori, PCB 28, 52 e PCB PCB 101, sono stati rilevati a livelli più elevati nei campioni di mangime che nel latte. Questi risultati ben si correlano con il riscontro che il PCB 138, PCB 153 e PCB 180 sono molto più resistenti agli attacchi metabolici enzimatici, mentre gli altri PCB indicatori sono più facilmente metabolizzati (Thomas et al. 1999; Roszko et al 2014).

Infine, quando la concentrazione dei PCB del campione di Caserta era correlata al contenuto lipidico emergeva costantemente una chiara relazione negativa, anche controllando il dato per l'età degli animali. La figura 8 mostra lo scatter plot relativo alle due variabili e la corrispondente

linea di regressione. La pendenza della linea è negativa e altamente significativa ( $p < 0.01$ ). Va notato che in media il contenuto lipidico nel latte dell'area di controllo era maggiore del valore relativo a Caserta sebbene con una differenza non statisticamente significativa.



*Fig. 2-5. Retta di regressione del contenuto lipidico (espresso in percentuale) sulla  $\Sigma 20\text{PCB}$  relativa al latte di Caserta.*

Questo riscontro suggerisce che alte concentrazioni di PCB possono indurre una riduzione del tenore di grassi e quindi una riduzione del valore nutrizionale di alcuni alimenti come il latte. Tale ipotesi è stata avanzata anche da alcuni autori che hanno osservato lo stesso risultato indagando gli

effetti dei PCB sul contenuto lipidico muscolare dell'anguilla Europea, alla base dell'insuccesso riproduttivo della specie (Geeraerts et al. 2007).

### 2.3.2 *Analisi dei livelli di PCB e POC nel muscolo di trota Mediterranea, correlazione con il grado di infestazione da parassiti intestinali.*

I risultati relativi all'analisi delle concentrazioni residuali degli OC nel muscolo di trota mostravano la predominanza dei PCB-NDL (e, nell'ambito di questa categoria di composti, prevalentemente dei sei congeneri "indicatori") seguiti dalla somma del DDT e suoi metaboliti, dalla somma dei PCB diossino simili (PCB-DL) mono-orto, dalla somma dei PCB-DL non-orto, dall'HCB e infine dal Dieldrin. Le tabelle 6 e 7 riportano i valori di concentrazione delle sommatorie dei PCB espressi sia su base lipidica che su base fresca, mentre le figure 9 e 10 paragonano i livelli di concentrazione, espressi su LW che su WW, dei diversi gruppi di PCB esaminati.

*Tab. 2-6. Statistiche descrittive, Bifenilipoliclorurati NDL e DL (ng/g WW)*

|       | $\Sigma 6$ | $\Sigma 7$ | $\Sigma 9$ | $\Sigma \text{PCBNDL}$ | $\Sigma 3\text{PCBDL}$ | $\Sigma 5\text{PCBDL}$ |
|-------|------------|------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Media | 6.58       | 7.29       | 2.58       | 9.15                   | 0.37                   | 1.16                   |
| DS    | 2.55       | 2.86       | 0.95       | 3.49                   | 0.21                   | 0.55                   |
| Min   | 3.61       | 4.00       | 1.46       | 5.10                   | 0.00                   | 0.49                   |
| Max   | 13.60      | 15.29      | 5.09       | 18.70                  | 0.74                   | 2.66                   |

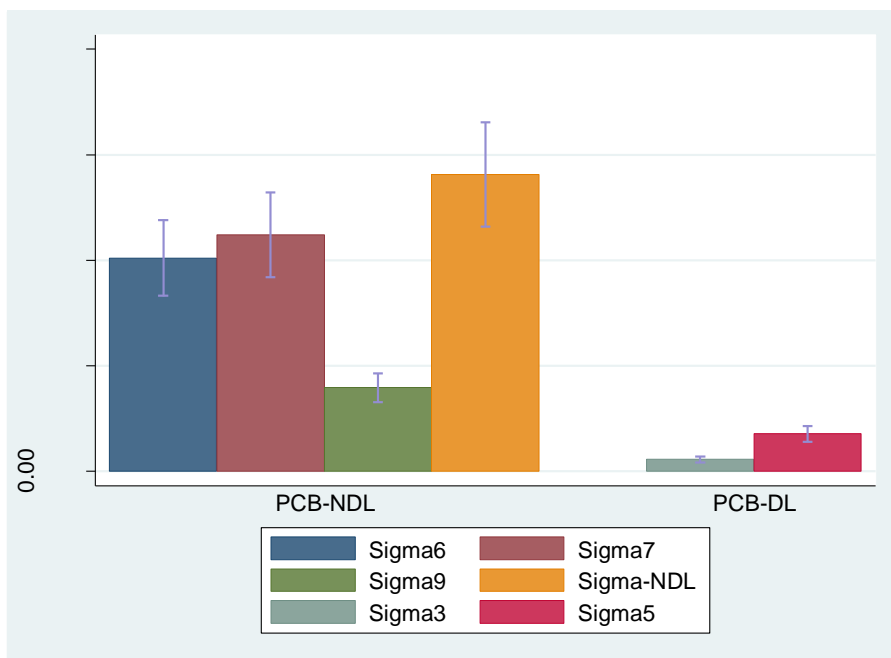
*Tab. 2-7. Statistiche descrittive, Bifenilipoliclorurati NDL e DL (ng/g LW)*

|  | $\Sigma 6$ | $\Sigma 7$ | $\Sigma 9$ | $\Sigma \text{PCBNDL}$ | $\Sigma 3\text{PCBDL}$ | $\Sigma 5\text{PCBDL}$ |
|--|------------|------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|--|------------|------------|------------|------------------------|------------------------|------------------------|

## Parte seconda - Sperimentale

|       |        |        |        |        |       |       |
|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Media | 201.99 | 223.95 | 79.19  | 281.18 | 11.28 | 35.44 |
| DS    | 80.69  | 90.61  | 30.79  | 111.23 | 6.53  | 16.85 |
| Min   | 97.82  | 107.33 | 42.20  | 140.03 | 0.00  | 14.61 |
| Max   | 408.04 | 458.78 | 152.82 | 560.86 | 22.04 | 79.79 |

*Nota:  $\Sigma 6\text{PCB}$  corrisponde alla somma dei sei congenieri indicatori;  $\Sigma 7\text{PCB}$  corrisponde alla somma dei sei congenieri indicatori insieme al PCB 118;  $\Sigma 9\text{PCB}$  corrisponde alla somma dei rimanenti congenieri di PCB-NDL;  $\Sigma \text{PCB-NDL}$  è la somma di tutti i 15 PCB-NDL;  $\Sigma 3\text{PCB-DL}$  è la somma dei tre congenieri non-orto di PCB-DL;  $\Sigma 5\text{PCB-DL}$  è la somma dei 5 congenieri di PCB-DL mono-orto.*



*Fig. 2-6. Livelli di PCB per gruppi di composti espressi su base lipidica (LW).*

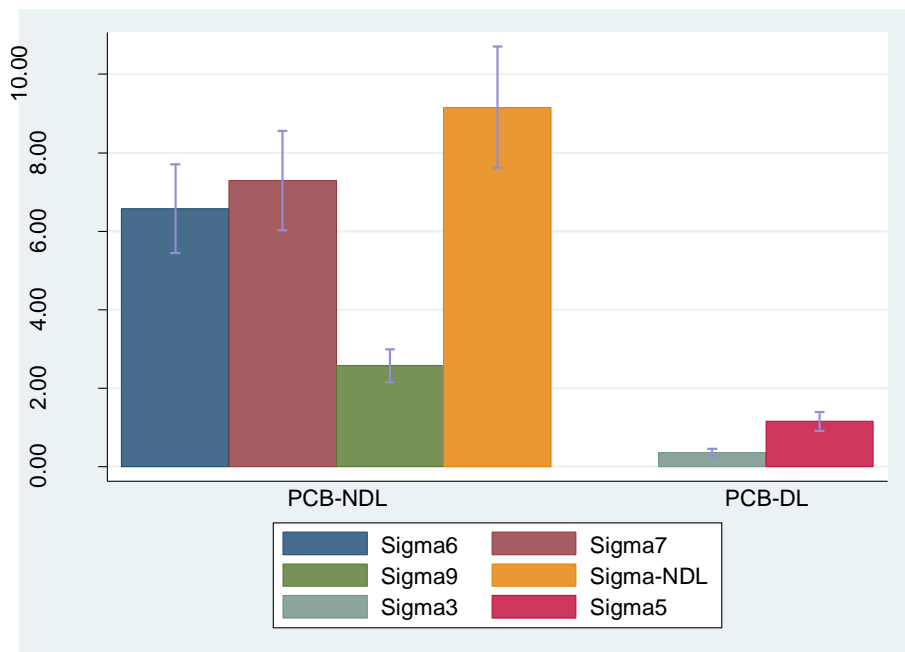


Fig. 2-7. Livelli di PCB per gruppi di composti espressi su base fresca (WW).

Per quanto concerne il pattern di distribuzione dei PCB indicatori è stata osservata la prevalenza del PCB 153 e del PCB 138 (rispettivamente il 31% e il 25% circa in media della  $\Sigma 6\text{PCB}$ ) seguiti in ordine decrescente dai congeneri di PCB epta-penta-tetra-clorurati IUPAC nos. 180, 101, 28, 52. I congeneri NDL non indicatori ( $\Sigma 9\text{PCB}$ ) costituivano solo una parte limitata della  $\Sigma 15\text{PCB}$  con una percentuale calcolata sul valore medio del 28%. Va sottolineato tuttavia, che, nonostante il ridotto apporto percentuale al valore totale riferito ai PCB-NDL, i congeneri non indicatori analizzati sono stati rilevati in tutti i campioni di trota ad eccezione del PCB 194 e del PCB 196 (riportati rispettivamente nel 59% e nel 63% del campione).



Le concentrazioni dei due sottogruppi di PCB-DL misurati ( $\Sigma 3\text{PCB-DL}$  e  $\Sigma 5\text{PCB-DL}$ ) risultavano sempre molto inferiori ai  $\Sigma 6\text{PCB}$  e nell'ordine di alcune decine di ppb quando le concentrazioni erano espresse su LW (Figura 11). Inoltre, è interessante notare la costante assenza, nel primo sottogruppo, del PCB 169 e del 126 associata alla presenza del PCB 77 nel 81% delle trote; nel secondo sottogruppo si rileva la mancanza del PCB 157 che si contrappone al riscontro del PCB 118 (un ex congenere indicatore) e del PCB 105 nella totalità del campione analizzato (Figura 12).

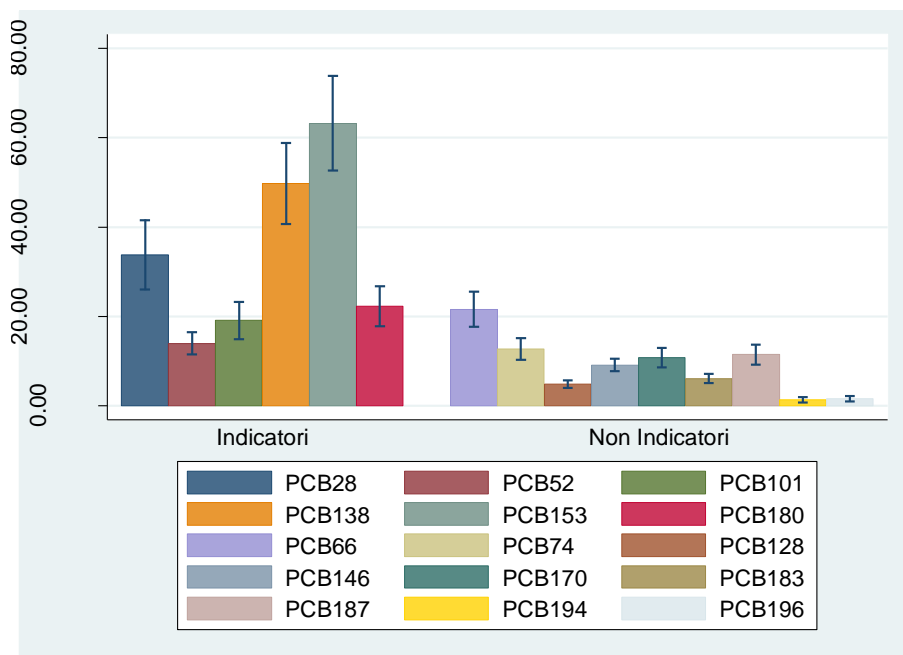


Fig. 2-8. Livelli di singoli congeneri di PCB-NDL espressi su base lipidica (LW).

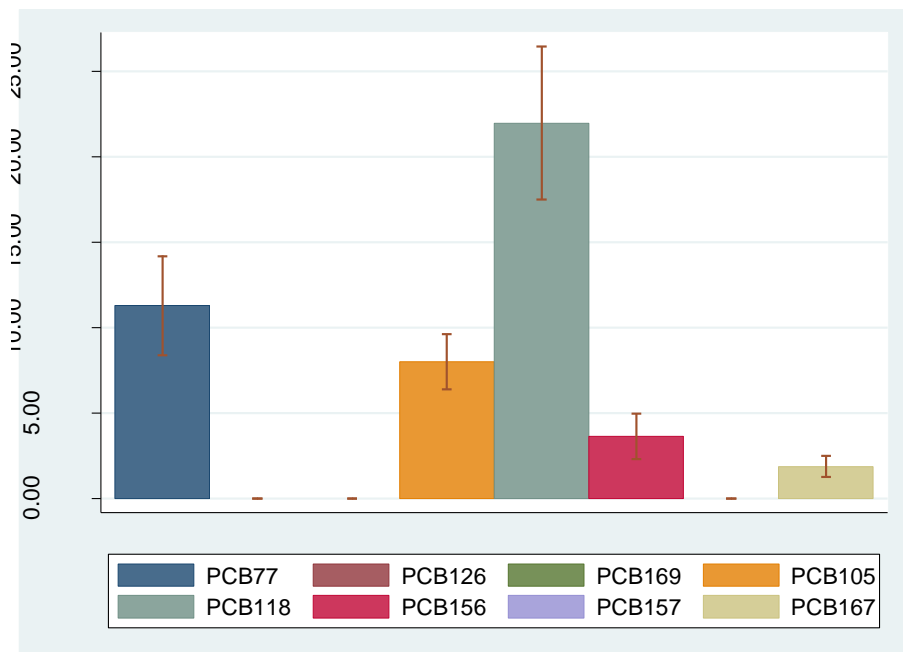


Fig. 2-9. Livelli di singoli congeneri di PCB-DL espressi su base lipidica (LW).

Le Tabelle 6 e 7 e le Figure 13 e 14 riportano i risultati dell'analisi descrittiva dei POC. I livelli risultavano in genere bassi eccetto quelli relativi al p,p'-DDE, rilevato in tutte le unità campionarie (da una concentrazione minima di 38.33 ng g<sup>-1</sup> LW a un valore massimo di 228.42 ng g<sup>-1</sup> LW).

Anche il p,p'-DDD era riscontrato nella maggior parte delle trote analizzate (81%) mentre il p,p'-DDT era presente solo nel 27% delle unità campionarie.

## Parte seconda - Sperimentale

*Tab. 2–8. Statistiche descrittive, Pesticidi Organoclorurati (ng/g WW)*

|              | <b>HCB</b> | <b>Dieldrin</b> | <b>ppDDT</b> | <b>ppDDE</b> | <b>ppDDD</b> | <b>ΣDDT</b> |
|--------------|------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>Media</b> | 0.27       | 0.04            | 0.03         | 3.19         | 0.06         | 3.28        |
| <b>DS</b>    | 0.11       | 0.05            | 0.05         | 1.46         | 0.06         | 1.45        |
| <b>Min</b>   | 0.10       | 0.00            | 0.00         | 1.42         | 0.00         | 1.43        |
| <b>Max</b>   | 0.49       | 0.14            | 0.20         | 7.61         | 0.23         | 7.61        |

*Tab. 2–9. Statistiche descrittive, Pesticidi Organoclorurati (ng/g LW)*

|              | <b>HCB</b> | <b>Dieldrin</b> | <b>ppDDT</b> | <b>ppDDE</b> | <b>ppDDD</b> | <b>ΣDDT</b> |
|--------------|------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| <b>Media</b> | 8.09       | 1.25            | 0.79         | 97.57        | 1.86         | 100.23      |
| <b>DS</b>    | 3.12       | 1.60            | 1.78         | 43.45        | 1.94         | 43.69       |
| <b>Min</b>   | 2.63       | 0.00            | 0.00         | 38.33        | 0.00         | 42.72       |
| <b>Max</b>   | 13.97      | 5.09            | 7.51         | 228.42       | 8.60         | 228.42      |

*Nota: ΣDDT corrisponde alla somma del p,p'-DDT, p,p'-DDE e p,p'-DDD.*

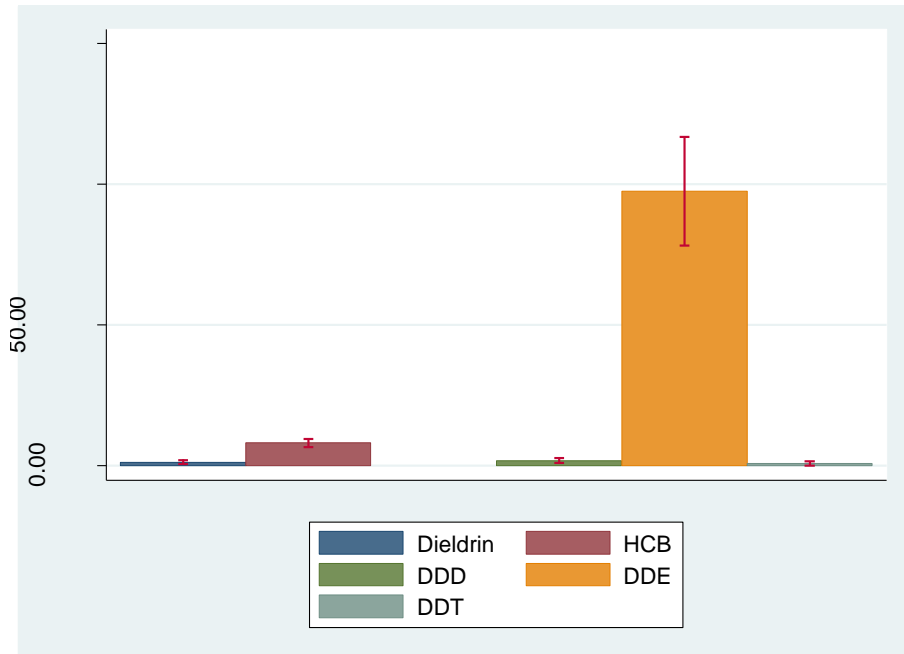


Fig. 2-10. Livelli di singoli POC espressi su base lipidica (LW)

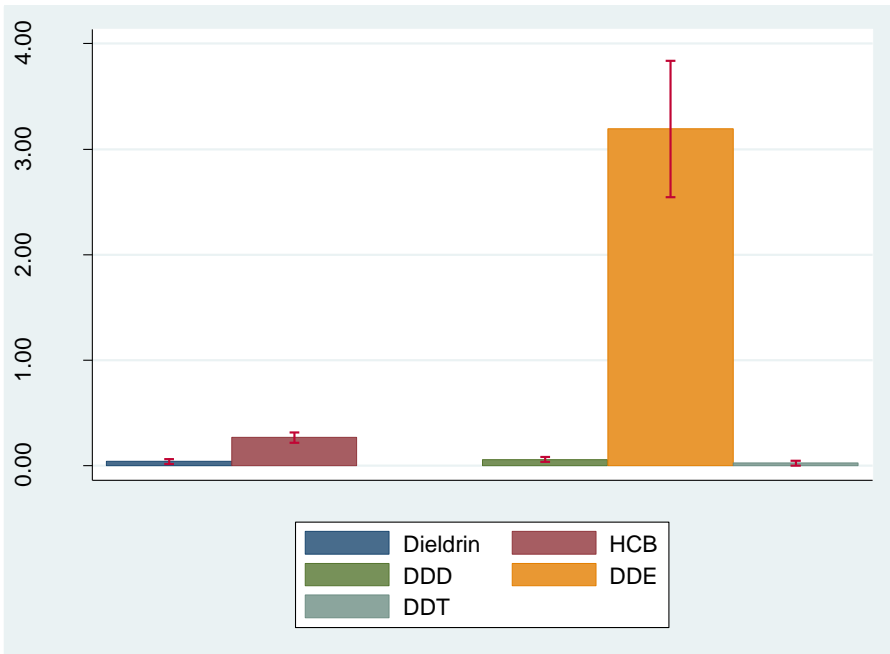


Fig. 2-11. Livelli di singoli POC espressi su base fresca (WW)

La regressione dei parassiti intestinali sui livelli medi di concentrazione della  $\Sigma 6\text{PCB}$  sia su base lipidica che su base fresca, non evidenziava una correlazione sebbene fosse presente una lieve riduzione dei livelli degli OC nei soggetti nei quali era stata riscontrata una infestazione parassitaria intestinale da nematodi, acantocefali e da elminti, in particolare da *Crepidostomum metoecus* appartenente alla classe dei trematodi.

Lo stesso risultato era registrato nello studio di correlazione fatto utilizzando  $\Sigma 7\text{PCB}$  o  $\Sigma \text{PCB-NDL}$ ,  $\Sigma 3\text{PCB-DL}$  e  $\Sigma 5\text{PCB-DL}$  (Tabella 10).

La mancanza di correlazione si osservava anche utilizzando valori di concentrazione riferiti ai singoli campioni. La stessa risposta si evidenziava effettuando l'analisi con le concentrazioni di  $\Sigma$ DDT.

Tab. 2-10. Correlazione tra presenza di parassiti e organoclorurati.

|                   | $\Sigma 6$<br>(ww) | $\Sigma 6$<br>(lw) | $\Sigma 15$<br>(lw) | $\Sigma 15$<br>(ww) | $\Sigma$ DDT<br>(lw) | $\Sigma$ DDT<br>(ww) |
|-------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| <b>Indicatore</b> | -0.16              | -0.28              | -0.28               | -0.16               | -0.23                | -0.10                |
| <b>Parassiti</b>  |                    |                    |                     |                     |                      |                      |

*Nota: La tabella riporta i valori del coefficiente di correlazione tra la variabile indicatore della presenza o meno di parassiti e varie misure di concentrazione degli organoclorurati (su LW e WW).*



Per quanto concerne la specie esaminata, gli studi condotti sono nella maggior parte studi sperimentali, che analizzano, in condizioni controllate, gli effetti di alcuni PCB o delle miscele commerciali su alcuni parametri o attività metaboliche come già riportato nel paragrafo riguardante la tossicità nei pesci. Ad esempio, Wiseman e Vijayan, (2011) evidenziarono nella trota iridea come l'Aroclor 1254 alteri il metabolismo epatico del glicogeno e aumenti la glicogenolisi mediata da agenti stressogeni. Nault et al. (2012) osservarono sempre nella trota iridea che l'esposizione a dosi sub-letali di PCB induce una maggiore richiesta e mobilitazione di energia da parte dell'animale con alterazione dei processi di respirazione mitocondriale.

Gli studi di monitoraggio, tesi all'analisi dei livelli di contaminazione da organoclorurati condotti sulla salmo trutta o altre specie del genere salmo, sono invece scarsi per quanto di mia conoscenza.

Piskorska-Pliszczynska e collaboratori (2012) evidenziarono in specie ittiche provenienti dalle aree di pesca polacche del Mar Baltico, tra cui la trota di mare (*Salmo trutta m.trutta*), livelli medi di concentrazione relativi ai sei congeneri indicatori, di poco superiori a quelli qui riportati (38.66 ng/g WW). Houde et al. (2008) misurarono in campioni di trota di lago provenienti dal Canada, concentrazioni medie di una somma di PCB, tra cui i congeneri analizzati in questo lavoro di tesi, tra 1.67 e 2,890 ng/g WW.

Recentemente, Pacini et al (2013) hanno condotto uno studio per monitorare i livelli di PCB e diossine in specie ittiche di acqua dolce provenienti da diversi specchi d'acqua della regione Campania. Tra le specie esaminate, la *Salmo trutta fario* (dal fiume Sabato, Avellino) e la trota iridea (dal Sarno, Salerno), nelle quali furono evidenziate concentrazioni medie relative alla somma dei sei congeneri indicatori, rispettivamente di 1.30 e 5.77 ng/g LW. Tali valori risultano molto più bassi rispetto a quelli evidenziati nei campioni provenienti dalla Calabria. Tuttavia, in genere, i livelli riscontrati da Pacini anche nelle altre specie esaminate sono molto più bassi di quelli descritti in altri lavori di monitoraggio condotti in regione Campania (ad esempio Ferrante et al., 2016, 2010). Tali differenze potrebbero essere spiegate con i diversi gradi di contaminazione ambientale dell'area di provenienza. Tuttavia, tale ipotesi non trova facile conferma per la mancanza di dati in letteratura

riferiti, in generale alla Calabria e, in particolare tra le specie ittiche, alla trota.

Per quanto concerne i dati sulla contaminazione ambientale della regione Calabria, anche in questo caso non vi sono molti lavori che ci consentono di interpretare meglio i risultati ottenuti e correlarli. Inoltre, le poche ricerche pubblicate analizzano matrici diverse dal muscolo di trota. Provini e coautori (1999) misurarono la presenza di PCB e POC nelle uova di diverse specie di uccelli terrestri e acquatici provenienti da diverse aree della Calabria evidenziando più alti valori di PCB nelle specie predatrici terrestri (gheppio) (1985 vs 1361 ug/kg di peso secco) e più alti livelli di POC nelle specie acquatiche (anatra selvatica) (83 vs 106 ug/kg di peso secco). Tali differenze sarebbero, secondo gli autori, imputabili alle diverse fonti degli inquinanti che implica un maggiore riversamento dei pesticidi nell'ecosistema acquatico e una maggiore presenza dei PCB in quello terrestre dove sorgono gli impianti di produzione delle miscele commerciali. Naccari e collaboratori (2004) analizzarono PCB e POC in diversi tessuti e organi di cinghiali provenienti da diverse aree della Calabria. I ricercatori osservarono bassi livelli residuali di POC e concentrazioni di PCB addirittura sotto il limite di rilevabilità. Infine, i livelli di OC rilevati nel latte di asine provenienti da aziende dislocate sul territorio della Calabria risultano inferiori a quelli riportati nella presente tesi anche se dello stesso ordine di grandezza (ad es 178.14 ng g<sup>-1</sup> lw per  $\Sigma$ 6PCB) (Di Bella *et al.*, 2014).

Alcuni autori hanno invece ricercato i metalli pesanti in una varietà di matrici di origine ovina (latte e derivati, tessuti animali) (Caggiano *et al.*,



2005) o in campioni di latte bovino della Calabria (Licata et al., 2004) rivelando la presenza di questi inquinanti a livelli che è opportuno monitorare nel tempo per analizzarne le fonti e per seguire le possibili implicazioni sulla salute animale e umana.

E' interessante constatare che, per quanto concerne i PCB, il pattern dei congeneri è abbastanza simile a quello riportato in tanti lavori che ne monitorano la diffusione nell'ambiente acquatico, con più alti livelli dei PCB 153 e 138, seguiti dal PCB 180 e 118 (ad esempio Ferrante et al., 2010; Malarvannan et al., 2014). Tali congeneri, sono i più abbondanti nelle miscele di PCB commerciali, come ad esempio Aroclor 1254 e 1260, le più comunemente usate nei Paesi Europei. I congeneri sopra menzionati sono maggiormente presenti anche in virtù della loro elevata lipofilia, stabilità, e persistenza che ne facilitano l'assorbimento ai sedimenti e quindi l'accumulo nell'ecosistema acquatico. Il PCB153, 138,180 e 118 a causa del loro elevato grado di clorurazione e alla mancanza di atomi H adiacenti non sostituiti in posizione orto-meta e/o meta-para sull'anello aromatico tendono ad essere refrattari agli attacchi enzimatici delle monoossigenasi e, di conseguenza, essere più lentamente eliminati (Walker, 2001). I tri- e tetraclorobifenili (PCB 28, 52, 74, e 66) e gli octa-bifenili (PCB 201, 196, e 194), quando presenti, sono stati rilevati in concentrazioni notevolmente inferiori rispetto ai congeneri epta-, esa-, e penta-clorurati. Gli omologhi meno clorurati hanno un più basso logKow (logaritmo del coefficiente ottanolo/acqua) e, di conseguenza, hanno una bassa propensione a lasciare l'ambiente acquoso per distribuirsi in compartimenti organici. Inoltre, una volta introdotti dagli organismi viventi, essi sono di solito più rapidamente metabolizzati rispetto ai

congeneri più clorurati a causa della presenza di posizioni sul loro anello bifenile più disponibili per l'attacco metabolico. I congeneri più clorurati come gli octa-clorurati, invece, avendo un alto logKow (da 7.62 a 7,80) sono facilmente adsorbiti ai sedimenti, e solo una piccola frazione rimane nella frazione disciolta risultando disponibile per il processo di bioconcentrazione passiva (Gray, 2002).

In generale, i livelli evidenziati di pesticidi dimostrano un utilizzo di tutti i composti soprattutto del diclorodifeniltricloroetano. Tuttavia, tale impiego è largamente imputabile ad un utilizzo passato dei POC anche se 4 campioni su 22 mostrano la presenza anche del composto parentale che indica un impiego recente, anche se limitato, del pesticida. Il rapporto DDE/DDT, calcolato utilizzando per entrambi i valori medi di concentrazione su LW è molto superiore ad uno (precisamente 123). Questo alto valore potrebbe essere spiegato con l'alimentazione delle trote che si basa prevalentemente di crostacei, oltre che insetti e piccoli pesci, che vivono a contatto dei fondali e quindi dei sedimenti che sono i principali serbatoi dei metaboliti degli inquinanti. Il rapporto DDE/DDT, che viene utilizzato per stabilire il momento presunto dell'immissione del pesticida nell'ambiente, (Bordajandi et al., 2003) indica che per le trote del Parco della Sila, l'utilizzo è stato molto intenso ma prevalentemente passato. Il riscontro del Dieldrin e dell'HCB, anch'essi come il DDT vietati ormai da diversi anni, indica un riversamento recente. Il rilevamento appare interessante anche considerando l'assenza di un loro riscontro negli ultimi anni in diversi studi condotti sui prodotti della pesca o altre matrici ed è chiaramente rapportabile all'utilizzo dei pesticidi nei terreni agricoli adiacenti il Parco. Inoltre, il riscontro dell'HCB può essere

associato non solo al suo precedente uso come fungicida nel trattamento delle sementi ma anche al fatto che esso è un sottoprodotto nei processi manifatturieri di diverse sostanze chimiche contenenti cloro ed è un'impurità in diversi altri pesticidi (Bailey, 2001).

La mancanza di correlazione tra l'indicatore infestazione da parassiti intestinali (acanto cefali, nematodi e trematodi quali il *crepidostomum metoecus*) e le varie classi di OC non consente di fornire un apporto al discorso sulla possibile implicazione che i contaminanti organoclorurati abbiano o meno un ruolo nel favorire, in seguito all'azione immunosoppressiva, una maggiore predisposizione all'infestazione parassitaria; oppure se sia l'infestazione parassitaria in corso a determinare una riduzione dei livelli tissutali dei contaminanti nell'organismo parassitato attraverso una distribuzione dei contaminanti anche nei parassiti.

### 2.3.3 Valutazione del Rischio Tossicologico

La valutazione del rischio tossicologico per le specie analizzate è in generale di difficile effettuazione in quanto sono pochi i lavori presenti in letteratura che riportano gli effetti tossici conseguenti all'esposizione a specifiche concentrazioni di contaminanti clorurati. Mentre nel caso di specie, quali ad es. l'Anguilla europea, il fenomeno di declino delle popolazioni osservato negli ultimi anni ha spinto molti ricercatori a indagare sulle possibili cause, includendo tra queste l'eventuale azione dell'inquinamento ambientale, per tante altre specie quali la trota questa valutazione non è stata fatta. Si può ipotizzare che i livelli osservati di POC (principalmente il DDE) e PCB (soprattutto alcuni indicatori come i

PCB138 e 153) siano tali da influenzare la fisiologica risposta immunitaria e non si può del tutto escludere una loro influenza sulla capacità riproduttiva.

Per quanto concerne la valutazione del rischio per il consumatore correlato ad una esposizione ai PCB, la Comunità Europea ha recentemente stabilito dei LMR per vari prodotti di origine animale relativi oltre che alle diossine e ai PCB-DL, anche alla somma dei sei congeneri di PCB definiti "congeneri indicatori" (Regolamento della Commissione EU No 1259/2011 del 2 Dicembre 2011). La somma delle concentrazioni riferite a tali PCB indicatori (PCB 28, 52, 101, 138, 153 e 180) comprende circa la metà della quantità totale di PCB-NDL presenti nei prodotti alimentari e nei mangimi. Questo valore somma è considerato, quindi, dalla Comunità Europea, come un marcatore adeguato per valutare la diffusione ambientale e l'esposizione umana ai PCB-NDL.

Il latte e i prodotti lattiero-caseari destinati al mercato non devono contenere concentrazioni relative alla somma dei sei congeneri indicatori, superiori a 40 ng/g di LW. Tale soglia è riferita ai prodotti che contengono più del 2% di grasso. Per i cibi che presentano un contenuto lipidico inferiore al 2% (come nel caso dei campioni di latte di capra esaminati), il LMR viene espresso come concentrazione su WW ed è calcolato come il prodotto del LMR già indicato moltiplicato 0.02. Per il latte crudo, tale limite corrisponde a 0.08 ng/g WW. Tutte le unità campionarie relative a Caserta (tranne una) presentavano concentrazioni superiori al limite relativo alla  $\sum 6\text{PCB}$ .

Per quanto riguarda l'HCB, sono state evidenziate concentrazioni superiori al LMR espresso su LW (0.01 mg kg<sup>-1</sup>) in 4 casi. Il limite utilizzato come riferimento è stato quello fissato per il latte crudo di specie diverse dalla bovina stabilito in Italia dal Decreto Ministeriale 13 maggio 2005 (III allegato).

Latte e latticini sono parte di una dieta mediterranea sana che, oltre a latte vaccino, include il latte di pecora, bufala e capra da soli o in miscela. L'impiego della capra come fornitori di alimenti (sia latte e derivati che carne) è ben noto e risale almeno a partire dal 2500 A.C., in Medio Oriente (Salah 2005). In virtù dei riconosciuti benefici per la salute, il consumo di latte di capra e dei suoi prodotti derivati è andato in aumento in diversi paesi Europei a partire dal 1980. Di conseguenza è andato aumentando anche l'interesse per l'allevamento della capra. L'Europa ha prodotto nel 2010 il 15,6% del volume mondiale di latte di capra, anche se possiede solo 9,8 milioni di capre da latte che corrisponde al 5,1% del patrimonio mondiale (FAOSTAT 2012).

Latte e prodotti derivati sono, tuttavia, spesso considerati una delle principali fonti di esposizione umana ai PCB (Domingo e Bocio 2007). Prendendo in considerazione il consumo medio di 16 diversi tipi di alimenti esaminati dall'EFSA (2012), quelli lattiero-caseari sono risultati al secondo posto per le concentrazioni di PCB su WW. L'assunzione totale dei sei indicatori è stata stimata tra 4,3 e 25,7 ng/kg di peso corporeo al giorno, a seconda della popolazione europea considerata. I valori corrispondenti al 95° percentile sono 7,8 e 53,7 ng/kg di peso corporeo al giorno.

Anche se non è stato raggiunto un accordo su circa la definizione di una dose giornaliera tollerabile (TDI) i PCB indicatori, diverse istituzioni nonché il RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Paesi Bassi, Istituto Nazionale per la salute pubblica e l'ambiente) utilizzano il valore guida di 10 ng/kg/giorno per la caratterizzazione del rischio (Cimenci et al. 2013), che corrisponde a 700 ng/giorno per una persona di 70 kg di peso. La soglia è stata calcolata effettuando studi su animali in vivo. Una assunzione giornaliera che supera questa soglia dovrebbe potere causare rischi per la salute. Poiché, per Caserta, la concentrazione media del campione relativa alla  $\Sigma 6\text{PCB}$  è di 2 ng/g WW, attraverso l'assunzione di 100 ml di latte di capra consegue un apporto di 200 ng, che è circa un terzo della TDI suggerita. Il consumo di 100ml di latte di capra sembra abbastanza ragionevole se si considerano l'elevato numero di persone affette da allergie alle componenti del latte di mucca e disturbi gastrointestinali presente in molti paesi sviluppati (Haenlein 2004). Inoltre, nel calcolo complessivo, sarebbe opportuno anche prendere in considerazione l'introduzione di altri alimenti altamente contaminati da PCB, come, per esempio, le anguille (Ferrante et al., 2010).

Per quanto concerne invece l'esposizione agli OC attraverso il consumo di trote, il regolamento 1259/2011 fissa per il muscolo di pesce d'acqua dolce selvatico, ad eccezione delle specie di pesce diadrome catturate in acqua dolce e prodotti derivati, un LMR di 125ng/g WW. Dall'esame dei dati ottenuti esaminando le trote del Parco della Sila si evince che per nessun campione esaminato il valore di  $\Sigma 6\text{PCB}$  supera tale limite.

Per quanto concerne i PCB-DL, la valutazione della tossicità dei congeneri si basa sulla definizione dei Fattori di Tossicità Equivalente (WHO - World Health Organization - TEF) (Van den Berg, 1998). In breve, la concentrazione di ciascun PCB-DL in un campione è moltiplicato per il corrispondente WHO-TEF e successivamente sommato per ottenere la concentrazione totale dei composti diossino-simili espressi in WHO-TEQ (WHO-Quantità Tossica Equivalente). Tale valore andrebbe sommato a quello relativo alle diossine e furani e confrontato con il limite di riferimento. I TEF riferiti ai congeneri esaminati sono 0.001, 0.1 e 0.03 rispettivamente per il PCB77, 126 e 169 e 0.00003 per gli altri congeneri mono-orto. Anche in questo caso, come per la somma dei congeneri indicatori, le concentrazioni misurate sono sempre inferiori al LMR di 3 pg/g su WW stabilito dal suddetto Regolamento e che possiamo considerare riferibile ai soli PCB-DL.

Per quanto riguarda i pesticidi, i limiti massimi residuali relativi ai pesci ed ai prodotti della pesca sono stabiliti dal Decreto Ministeriale 13 maggio 2005 (IV allegato) nel quale sono riportati limiti differenziati in base alla diversa composizione percentuale in grassi. Tutti i campioni di trota analizzati nel presente lavoro mostrano una percentuale lipidica <5%, rientrando nel gruppo 1, con un LMR fissato di 0.050, 0.010 e 0.005 µg/g su WW rispettivamente per  $\sum$ DDT, HCB e Dieldrin. I dati ottenuti mostrano come nessuna unità campionaria superi i livelli stabiliti dalla normativa Italiana per i pesticidi organoclorurati studiati.

## 2.4 Conclusioni

I risultati relativi al latte di capra adoperato come indicatore della diversa contaminazione da OC di alcune aree della regione Campania, testimoniano l'esistenza di una relazione tra il rilascio incontrollato e abusivo di rifiuti di origine urbana e industriale e contaminazione da PCB. Infatti, poiché sono state campionate capre lasciate libere di pascolare, appartenenti cioè ad aziende che praticano il sistema di allevamento estensivo, i dati presentati suggeriscono un'elevata contaminazione a monte del suolo e del pascolo nell'area intorno Caserta, interessata appunto dalle pratiche illegali di smaltimento dei rifiuti gestite dall'ecomafia oltre a processi di combustione incompleta fonti di ingenti quantità di contaminanti clorurati. Partendo dal presupposto che la contaminazione del mangime introdotto dagli animali è direttamente correlata alla contaminazione degli alimenti da essi prodotti, i risultati, in ultima analisi, suggeriscono che l'inquinamento ambientale costituisce un problema rilevante per la salubrità degli alimenti stessi e per la derivante sicurezza del consumatore.

L'analisi dei dati del monitoraggio condotto in Calabria, nel Parco della Sila, dove sono stati campionati esemplari di trota Mediterranea suggeriscono la presenza di uno stato di fondo di inquinamento da contaminanti organici persistenti, sia PCB che pesticidi organoclorurati, pur risultando i livelli residuali, in generale, non pericolosi per la sicurezza del consumatore in quanto sempre sotto i limiti massimi stabiliti dalla normativa Europea e nazionale. Lo studio non consente tuttavia di trarre



conclusioni definitive sul livello di contaminazione da OC di un territorio a tutt'oggi poco studiato. I piani di monitoraggio andrebbero incrementati interessando altre specie ittiche e terrestri allo scopo di fare chiarezza su quanto riportato in letteratura. Per la Calabria i dati, sono infatti pochi, frammentari e spesso contrastanti perché seppure vengono analizzate matrici diverse, alcuni indicano la presenza di uno stato di contaminazione che andrebbe controllato nel tempo, altri, al contrario, sono più tranquillizzanti e lascerebbero ipotizzare addirittura l'assenza di fonti di inquinamento in regione.

La presenza dei PCB nei campioni di latte di Caserta e in quelli di trota della Calabria, quella del DDE, evidenziato quasi esclusivamente nel Parco della Sila, e quella dell'HCB osservato in entrambe le matrici, è indicativa dell'inquinamento dell'ecosistema terrestre e acquatico rispettivamente delle due aree di studio. E' possibile, quindi, commentare che nonostante siano trascorsi più di trenta anni dall'entrata in vigore delle leggi che ne limitano o vietano l'impiego in Italia, gli OC sono a tutt'oggi ampiamente presenti nelle aree monitorate. Tuttavia, il prevalere in genere del DDE nell'ambito della  $\Sigma$ DDT per la maggior parte delle unità campionarie suggerisce, che l'immissione nell'ambiente del DDT non è recente ma molto probabilmente risale al periodo subito successivo all'emanazione delle suddette leggi. Fanno eccezione solo poche unità campionarie, nelle quali la presenza del DDT, quale molecola parentale, si correla all'impiego illecito della sostanza durante le pratiche agricole estive-autunnali condotte sui terreni limitrofi.

Nell'ambito dei PCB, i NDL e soprattutto i congeneri indicatori mostrano concentrazioni molto più elevate dei PCB-DL come evidenziato in tutti gli altri studi di monitoraggio. Infatti, le loro concentrazioni nei sistemi viventi acquatici e terrestri sono di diversi ordini di grandezza superiori a quelle degli altri organoalogenati. I PCB-NDL sono, certamente meno tossici dei DL ma molto più diffusi e concentrati nelle matrici biologiche. Solo recentemente, è stato fissato un LMR per la somma di questi congeneri. Tale valore è suscettibile di variazioni qualora dagli studi sui meccanismi di tossicità di queste sostanze e da quelli di monitoraggio ambientale, non si evinca l'opportunità di abbassare il limite (eventualmente anche innalzarlo) a tutela della sicurezza del consumatore.

I risultati presentati confermano l'importanza degli studi di monitoraggio, eseguiti analizzando matrici alimentari derivanti da animali esposti, per la valutazione del grado di inquinamento ambientale, oltre che per l'analisi del rischio tossicologico per le stesse specie animali utilizzate come biomonitors e per l'uomo, consumatore di derrate di origine animale contaminate.

Nei due studi presentati sono stati analizzati anche altri due aspetti derivanti dalla esposizione agli OC. Il primo, quello della relazione negativa tra contenuto lipidico del latte di capra e concentrazione dei PCB, suggerisce che questi contaminanti potrebbero influenzare il valore nutritivo del prodotto. Tale risultato trova conforto in alcuni lavori della letteratura tra cui quelli che ipotizzano come ci sia una stretta correlazione tra l'aumento dei livelli tissutali di PCB e la progressiva diminuzione del contenuto lipidico muscolare nelle anguille selvatiche. Il secondo, relativo

alla correlazione tra OC e infestazione parassitaria non ha dato esito positivo per cui non è possibile sulla base dei dati ottenuti implicare un'influenza degli OC sull'esposizione agli agenti parassitari o viceversa.

- Lutter C., Iyengar V., Barnes R., Chuvakova T., Kazbekova G., Sharmanov T. 1998. Breast milk contamination in Kazakhstan: implications for infant feeding. *Chemosphere*. 37(9-12): 1761-72.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G., Smorong D.E., Lindscoog R.A., Sparks D.W., Smith J.R., Simon T.P., Hanacek M.A. (2002). Assessment of injury to fish and wildlife resources in the Grand Calumet River and Indiana Harbor Area of Concern, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 130-40.
- Maes G.E., Raymaekers J.A.M., Pampoulie C., Seynaeve A., Goemans G., Belpaire C., Volckaert F.A.M. (2005). The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquat. Toxicol.* 73: 99-114.
- Malarvannan G., Dirinck E., Dirtu A.C., Pereira-Fernandes A., Neels H., Jorens P.G., Gaal L.V., Blust R., Covaci A., 2013. Distribution of persistent organic pollutants in two different fat compartments from obese individuals. *Environ. Int.* 55, 33–42.
- Malins D.C., Krahn M.M., Myers M.S., Rhodes L.D., Brown D.W., Krone C.A., McCain B.B., Chan S-L. (1985). Toxic chemicals in sediments and biota from a creosote-polluted harbor: relationship with hepatic neoplasms and other hepatic lesions in English sole (*Parophrys vetulus*). *Carcinogenesis*. 6(10): 1463-9.
- Marcogliese D.J. e Cone D.K. (1997). Parasite communities as indicators of ecosystem stress. *Parasitologia*. 39: 227-32.
- Matthews H.B. e Matsumura F. (1969). Metabolic fate of dieldrin in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 17(4): 845-52.
- Matsumura F., Ghiasuddin S.M., 1983. Evidence for similarities between cyclodiene type insecticides and picrotoxin in their action mechanisms. *J. Environ Sci. Health, Part B*. B 18, 1-4.
- Mehendale H.M., Fields M., Matthews H.B. (1975). Metabolism and effects of hexachlorobenzene on hepatic microsomal enzymes in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 23(2): 261-5.
- Melancon M.J., Elcombe C.R., Vodcnik M.J., Lech J.J. (1981). Induction of cytochromes P-450 and mixed-function oxidase activity by

- polychlorinated biphenyls and  $\beta$ - naphthoflavone in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Phys. C.* 69: 219-26.
- Mendoza C.E., Shields J.B., Laver G.W., 1976. Body burden of hexachlorobenzene and its effects on some esterases in tissues of young male rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 38, 499-506.
- Michielsen C.C., Bloksma N., Klatter F.A., Rozing J., Vos J.G., van Dijk J.E., 1999. The role of thymus-dependent T cells in hexachlorobenzene-induced inflammatory skin and lung lesions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161, 180-91.
- Mullerova D., Kopecky J., 2007. White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res.* 56:375–381.
- Murphy K., Travers P., Walport M. 2008. *Immunobiology*. 7th ed. New York:Garland Science.
- Naccari F., Giofrè F, Licata P, Martino D, Calò M, Parisi N. (2004). Organochlorine pesticides and PCBs in wild boars from Calabria (Italy). *Environ Monit Assess.* 96(1-3):191-202.
- Naso B., Perrone D., Ferrante M.C., Bilancione M., Lucisano A. (2005) Persistent organic pollutants in edible marine species from the Gulf of Naples, Southern Italy *Sci Total Environ.* 343: 83-95.
- Nault R(1), Al-Hameedi S, Moon TW. (2012). Effects of polychlorinated biphenyls on whole animal energy mobilization and hepatic cellular respiration in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chemosphere.* 87(9):1057-62.
- Nelson J.A., 1973. Effects of DDT analogs and polychlorinated biphenyls (PCB) mixtures on 3H-estradiol binding to rat uterine receptor. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 236.
- Norstrom R.J. 1988. Bioaccumulation of plychlorinated biphenyls in Canadian wildlife. In: Crine JP (ed.) *Hazards, decontamination and replacement pf PCBs*. New York, Plenum.
- Nugegoda D, Kibria G. .(2016). Effects of environmental chemicals on fish thyroid function: Implications for fisheries and aquaculture in Australia. *Gen Comp Endocrinol.* 6480(16)30037-5.

- Ortega P., Hayes W.J.Jr., Durham W.F., Mattson A., 1956. DDT in the Diet of the Rat. Public Health Monogr. No 43, Public Health Serv. Public No. 484. U.s. Govt. Printing Office; Washington, D.C.
- Pacini N1, Abate V, Brambilla G, De Felip E, De Filippis SP, De Luca S, di Domenico A, D'Orsi A, Forte T, Fulgenzi AR, Iacovella N, Luiselli L, Miniero R, Iamiceli AL. (2013). Chemosphere. 90(1):80-8.
- Payne J.F., Kiceniuk J., Fancey L.L., Williams U., Fletcher G.L., Rahimtula A., Fowler B. (1988). What is a safe level of polycyclic aromatic hydrocarbons for fish: subchronic toxicity study of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45: 1983-93.
- Palstra A.P., Van Ginneken V.J.T., Murk A.J., Van Den Thillart G.E.E.J.M. (2006). Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? Naturwissenschaften. 93(3): 145-8.
- Pavan I., Baroffio C., Passini V., Bilei T., Pira E., Minoia C., 2003. Policlorobifenili: valori di riferimento. G Ital Med Lav Erg 25(1): 61-67.
- Piskorska-Pliszczyńska J(1), Maszewski S, Warenik-Bany M, Mikołajczyk S, Goraj L.(2012). Survey of persistent organochlorine contaminants (PCDD, PCDF, and PCB) in fish collected from the Polish Baltic fishing areas. 2012:973292.
- Pizzin G., Bentley S. 2006. Diossine, furani, PCB e alimenti di origine animale: stato dell'arte. Ann Fac Medic Vet Di Parma 247-264.
- Porterfield S.P. 2000. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals - potential impact on brain development. Environ Health Perspect. 108(Suppl. 3): 433-8.
- Portugal C.L., Cowell S.P., Fedoruk M.N., Butler C.M., Rennie P.S., Nelson C.C. 2002. Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding. Toxicol Applied Pharmacol. 179: 185-94.
- Provini A., Galassi S. (1999). Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in bird eggs from Calabria (southern Italy). Ecotoxicol Environ Saf 43(1):91-7

- Ramos, L., Eljarrat, E., Hernández, L.M., Alonso, L., Rivera, J., González, M.J. (1997). Levels of PCDDs and PCDFs in farm cow's milk located near potential contaminant sources in Asurias (Spain). Comparison with levels found in control, rural farms and commercial pasteurized cow's milks. *Chemosphere*, 35(10), 2167–2179.
- Rojanapo W., Tepsuwan A., Kupradinum P., Chutimataewin S., 1987. Modulation of hepatocarcinogenicity of aflatoxin B1 by the chlorinated insecticide, DDT. In: Nigam S.K., McBrien D.C.H. and Slater T.F. (eds.) *Eicosanoids, Lipid Peroxidation and Cancer*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 327-38.
- Roszeko, M., Szymczyk, K., Rzepkowska, M., Jedrzejczak, R. (2014). Seasonal variability of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) congener profiles in butter in Poland: Dietary risk evaluation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 49, 182–199.
- Saeedi Saravi S.S., Dehpour A.R., 2016. Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sci*. 145, 255-64.
- Safe S., 1980. Metabolism, uptake, storage and bioaccumulation. In: Kimbrough R.D. (ed.) *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphtalenes, dibenzodioxins and related products*. Elsevier, New York. pp. 81-107.
- Sagerup K, Helgason LB, Polder A, Strøm H, Josefsen TD, Skåre JU, Gabrielsen GW (2009). Persistent organic pollutants and mercury in dead and dying glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) at Bjørnøya (Svalbard). *Sci Total Environ*, 407(23):6009-16.
- Salah, G. (2005). Biodiversity in goats. *Small Ruminant Research*, 60, 75–81.
- Schantz S.L., Widholm J.J., Rice D.C. 2003. Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environ Health Perspect*. 111(3): 357-94.
- Selgrade, M.K., 2007. Immunotoxicity: the risk is real. *Toxicol Sci*. 100: 328–332.

- She J., Petreas M.X., Visita P., McKinney M., Sy F.J., Winkler J.J., Hooper K., Stephens R.D. 1998. Congener-specific analysis of PCBs in human milk from Kazakhstan. *Chemosphere*. 37(3): 431-42.
- Shirasu Y., Moriya M., Kato K., Lienard F., Tezuka H., Teramoto S., Kada T., 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutat. Res.* 40, 19-30.
- Sonne C., Dietz R., Born E.W., Leifsson P.S., Andersen S., 2008a. Is there a link between hypospadias and organochlorine exposure in East Greenland sledge dogs (*Canis familiaris*)? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 391-5.
- Stonard M.D., 1975. Mixed type hepatic microsomal enzyme induction by hexachlorobenzene. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1959-63.
- Storelli, M.M., Scarano, C., Spanu, C., De Santis, E.P., Busco, V.P., Storelli, A., & Marcotrigiano, G.O. (2012). Levels and congener profiles of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sheep milk from an industrialised area of Sardinia, Italy. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1413–1417.
- Sures B. (2006). How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. *J. Helminthol.* 80(2): 151-7.
- Sures B. e Knopf K. (2004 a). Individual and combined effects of cadmium and 3,3',4,4',5- pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the humoral immune response in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally infected with larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Parasitology*. 128(Pt 4): 445-54.
- Sures B. e Knopf K. (2004 b). Parasites as a threat to freshwater eels? *Science*. 304(5668): 209-11.
- Svobodová Z., Vykusová B., Máchová J., Hrbková M., Groch L. (1994). The long-term effects of PCBs on fish. In: Müller and Lloyd (eds.) *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. FAO, Fishing News Books, Oxford. p. 88-98.
- Tanabe S., Iwata H., Tatsukawa R. 1994. Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *Science of The Total Environment*. 163–177.



- Thomas, G.O., Sweetman, A.J., Jones K.C. (1999). Metabolism and body-burden of PCBs in lactating dairy cows. *Chemosphere*, 39, 1533–1544.
- Thorpe E., Walker A.I.T., 1973. The toxicology of dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with dieldrin, DDT, phenobarbitone,  $\beta$ -BHC and  $\gamma$ -BHC. *Food Cosmet. Toxicol.* 11, 433-42.
- Turrio-Baldassarri, L., Alivernini, S., Carasi, S., Casella, M., Fuselli, S., Iacovella, N., et al. (2009). PCB, PCDD and PCDF contamination of food of animal origin as the effect of soil pollution and the cause of human exposure in Brescia. *Chemosphere*, 76, 278–285.
- U.S. EPA (Environmental Protection Agency). 1994. Health assessment document for 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. U.S. Environmental Protection Agency (EPA/600/BP-92/001a-c).
- Usha Rani M.V., Reddi O.S., Reddy P.P., 1980. Mutagenicity studies involving aldrin, endosulfan, dimethoate, phosphamidon, carbaryl and Ceresan. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 25, 277-82.
- Vallack H.W., Bakker D.J., Brandt I., Broström-Lundén E., Brouwer A., Bull K.R., Gough C., Guardans R., Holoubek I., Jansson B., Koch R., Kuylenstierna J., Lecloux A., Mackay D., McCutcheon P., Mocarelli P., Taalman R.D.F. 1998. Controlling persistent organic pollutants-what next? *Environ Toxicol Pharmacol* 6: 143-75.
- Van den Berg M., Birnbaum L.S., Bosveld A.T., Brunstrom B., Cook P., Feeley M., et al. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106, 775 e792.
- Van den Thillart G.E.E.J.M., Dufour S., Ellie P., Volkaert F., Sebert P., Rankin C., Szekely C., van Rijnsingen J. (2005). Estimation of the reproduction capacity of European eel: EELREP Final Report. 272 p.
- Van Velsen F.L., Danse L.H.J.C., Van Leeuwen F.X.R., Dormans J.A.M.A., Van Logten M.J., 1986. The subchronic oral toxicity of beta-isomer of hexachlorocyclohexane in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 6, 697-712.
- Vidal-Martinez V.M., Aguirre-Macedo M.L., Norena-Barroso E., Gold-Bouchot G., Caballero-Pinzon P.I. (2003). Potential interactions between metazoan parasites of the Mayan catfish *Ariopsis assimilis* and

- chemicals pollution in Chetumal Bay, Mexico. *J. Helminthol.* 77(2): 173-84.
- Vighi M., Bacci E. 1998. *Ecotossicologia*. Unione tipografico Editrice torinese, Torino.
- Vos J.G., Faith R.E., Luster M.I. (1980). Immune Alterations. In: Kimbrough R.D. (ed.) *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalens and related compounds*. Elsevier Press, New York. p. 241.
- Walker C.H. 2001. Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. In: *Organic pollutants. An ecotoxicological perspective*. Taylor & francis, New York. pp. 121-37.
- Waller C., Juma B., Gray L.E., Kelce W. 1996. Three dimensional quantitative structure activity relationships for androgen receptor ligands. *Toxicol Applied Pharmacol.* 137: 219-27.
- Wang X., Xue Y., Gong P., Yao T., 2014. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Tibetan forest soil: profile distribution and processes. *Environ Sci Pollut Res* 21, 1897– 1904.
- Wang, G., Lu, Y., Han, J., Luo, W., Shi, Y., Wang, T., Sun, Y. (2010). Hexachlorobenzene sources, levels and human exposure in the environment of China. *Environment International*, 36, 122–130.
- Wania F. e Mackay D. (1996). Tracking the distribution of Persistent Organic Pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 30: 390-6.
- WHO Consultation: Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI) May 25-29 1998, Geneva, Switzerland.
- Wildemauwe C., Lontie J.F., Schoofs L., Larebeke N., 1983. The mutagenicity in procaryocytes of insecticides, acaricides and nematicides. *Residue Rev.* 89, 129-78.
- Wiseman S(1), Vijayan MM.(2011). Aroclor 1254 disrupts liver glycogen metabolism and enhances acute stressor-mediated glycogenolysis in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*154(3):254-60.
- Wojtowicz A., Ropstad E., Gregoraszczuk E. 2001. Estrous cycle dependent changes in steroid secretion by pig ovarian cells in vitro to polychlorinated biphenyl (PCB153). *Endocr Regul.* 35(4): 223-8.

- Wright A.S., Potter D., Wooder M.F., Donninger C., Greenland R., 1972. The effects of dieldrin on the subcellular structure and function of mammalian liver cells. *Food Cosmet. Toxicol.* 10: 311-22.
- Yeung H.Y., Wong C.C., Wong M.H., Wong C.K.C. (2003). Differential expression of CYP1A1 mRNA in gill, intestine and liver of tilapia fed with PCB Aroclor-1254 and Aroclor-1260 spiked food. *Chemosphere.* 52: 1659-65.
- Yu G.W., Laseter J., Mylander C., 2011. Persistent organic pollutants in serum and several different fat compartments in humans. *J. Environ. Public Health.* 2011, 417980.